



Universitatea Babeş-Bolyai

Facultatea de Biologie și Geologie

Stabilitatea genetică a hibridilor somatici *Solanum tuberosum* cv. Delikat + *Solanum bulbocastanum* și răspunsul lor la diferiți factori de stress

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat

Prof. Dr. Rákosy-Tican Elena

Doctoranda

Dénes Tünde-Éva

Cluj-Napoca

2015

Cuprins

Cuvinte cheie.....	2
I. PARTEA TEORETICĂ.....	2
I.1. Importanța economică și principalii patogeni ai cartofului.....	2
I.1.1. Mana târzie a cartofului	3
I.2. Coevoluția plantei și patogenului	4
I.3. Hibridarea somatică și stabilitatea genetică a hibrizilor obținuți	5
I.4. Stresul hidric	7
I.5. Hibrizii somatici între <i>Solanum tuberosum</i> și <i>Solanum bulbocastanum</i>, folosiți în această teză	8
II. OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT	9
III. MATERIALE ȘI METODE	10
III.1. Determinarea nivelului de ploidie a hibrizilor somatici.....	11
III.2. Caracterizarea citogenetică a compoziției genomului plantelor studiate	12
III.3. Vizualizarea reacției oxidative.....	13
III.4. Stres-selecția hibrizilor somatici.....	14
IV. Rezultate și discuții	15
IV.1. Determinarea nivelului de ploidie cu metode directe și indirecte.....	15
IV.2. Caracterizarea citogenetică a compoziției genomurilor hibrizilor somatici.....	17
IV.2.1. Compoziția genomului și constituția cromozomială a hibrizilor somatici.....	17
IV.3. Vizualizarea reacției oxidative.....	21
IV.3.1. Detectarea apei oxigenate	21
IV.3.2. Vizualizarea sintezei superoxizilor	23
IV.4. Stres-selecția hibrizilor somatici toleranți la secetă	24
IV.4.1. Pre-selecția <i>in vitro</i> a hibrizilor somatici toleranți la stresul hidric	24
IV.4.2. Acumularea biomasei proaspete în condiții de stres hidric.....	25
IV.4.3. Efectul stresului hidric asupra fotosintezei	27
V. CONCLUZII GENERALE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI.....	29
VI. BIBLIOGRAFIE SELECTATĂ.....	31

Cuvinte cheie

Hibrizi somatici, cartof, mana târzie, stabilitatea genetică, GISH, stresul hidric, fotosinteza, *Solanum tuberosum*, răspunsul la stres, speciile reactive de oxigen (ROS)

I. Partea teoretică

I.1. Importanța economică și principalii patogeni ai cartofului

Cartoful (*Solanum tuberosum* L.) ocupă locul al treilea la nivel mondial ca și suprafață cultivată, după orez și grâu. Datorită schimbărilor climatice și a creșterii consumului, este de așteptat ca importanța cartofului să crească în următorul secol (Obiedegwu și colab., 2015).

Planta este de origine Sud Americană, iar ameliorarea sa a început de mai mult de 7000 de ani, în Europa a fost introdus în anul 1570. În prezent, este cultivat în peste 100 de țări, din regiunile temperate, subtropicale și tropicale, unde, în ultimii ani a devenit a treia plantă de cultură (Bradshaw și colab., 2006).

În Europa, România cultura cartofului se situează pe locul trei din punctul de vedere al teritoriul cultivat, dar productivitatea este scăzută, situându-se numai pe locul șase. Consumul anual de cartofi în România arată o tendință de scădere, în anul 2012 a fost 98.3kg /cap de locuitor, mai puțin cu 6,4% decât valoarea din anul 2006 (Vlad și Done, 2014). Importanța acestei plante, este dovedită și folosirea denumirii de "a doua pâine" a românilor (Baciu și colab., 2009).

Prin procesul de ameliorare, cartoful a trecut printr-o serie de schimbări, stolonii au devenit mai scurți, tuberculii mai mari, a scăzut conținutul de glicocalcozi și s-a schimbat forma și culoarea fructului (Chaudhary, 2013).

Datorită schimbărilor evolutive în timpul ameliorării, cartoful a devenit mai sensibil la stresul biotic și la cel abiotic. Momentan, această cultură este protejată de boli și dăunători cu ajutorul pesticidelor. În fiecare an, miliarde de dolari sunt cheltuite pentru a combate atacul patogenilor și cel al insectelor erbivore. De exemplu, boala mana târzie cauzează pierderi de 3 miliarde de dolari anual, costuri ce acoperă controlul patogenului dar și pierderile de producție (Fry, 2008).

Cei mai devastatori patogeni, care produc cele mai mari pagube au caracteristici comune, care asigură succesul lor, chiar dacă aparțin unor taxoni diferiți

Boala cunoscută sub denumirea de mană târzie este produsă de oomiceta *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (1876), care este responsabilă pentru cele mai multe pierderi cauzate de fitopatogeni. Caracterizarea patosistemelor este esențială pentru a înțelege coevoluția dintre gazdă și patogen, dar și pentru a dezvolta un control mai eficient, împotriva bolii respective.

Folosirea insecticidelor, bactericidelor și a fungicidelor a devenit inefficientă în ultima perioadă și de aceea, folosirea unor metode biotehnologice noi, împreună cu ameliorare țintită a cartofului, ar putea reprezenta cea mai bună opțiune pentru a minimaliza pierderile.

I.1.1. Mana târzie a cartofului

Phytophthora infestans este un patogen hemibiotrof, care în stadiul timpuriu al infecției are nevoie de țesut viu, această perioadă poate să dureze mai multe zile (Termorshuizen, 2007).

Mana târzie a lăsat un semn în istoria omenirii, datorită importanței mari a cartofului în nutriția omului. Cel mai cunoscut caz, este Marea Foamete din secolul al 19-lea din Irlanda, care a produs pierderea substanțială a randamentului productiv și a provocat moartea și emigrarea a peste două milioane de oameni (Goss și colab., 2014).

Oomiceta are capacitatea de a dezvolta rezistență față de fungicidele moderne, având o mare genetică în ceea ce privește virulența, fiind capabilă să atace soiuri de cartof rezistente la mană (Jo și colab., 2011).

Phytophthora infestans are două tipuri de împerechere A1 și A2 și se poate reproduce atât sexuat cât și asexuat. Reproducerea sexuată crește varietatea genetică, oosporii produși sunt mai rezistenți iar boala produsă devine mai severă (Turkensteen și colab., 2000). Prin reproducerea sexuată crește variabilitatea genetică, ceea ce poate determina apariția de noi tulpini, noi genotipuri care se adaptează mult mai rapid și produc boli mai severe (Vleeshouwers și colab., 2011).

I.2. Coevoluția plantei și patogenului

Interacțiunea între plantă și patogen este un proces complex, fiecare membru al interacțiunii a dezvoltat “arme de atac” și sisteme complexe de apărare. Patogenii au dezvoltat diverse strategii pentru a intra în plantă, de exemplu pot intra prin stomate sau prin răni, ajungând în spațiul intercelular.

Oomiceta invaginează haustori în membrana plasmatică a plantei, prin această metodă crează o interfață pentru următoarele etape ale interacțiunii. În mod similar cu alți patogeni, prima dată, se confruntă cu imunitatea bazală a plantei, care reprezintă primul nivel al sistemului de apărare. Receptorii transmembranari (transmembrane pattern recognition receptors (PRRs)) detectează modelul moleculelor bine conservate ale patogenului (PAMP), care pot fi peptide, polizaharide bacteriene chitină, sau beta-glucan în cazul fungilor sau oomicetelor. Confruntarea conduce la activarea primului răspuns imun (PTI-PAMP-triggered immunity) (Rouxel și Balesdent, 2010).

Patogenii de succes au capacitatea de a suprima acest răspuns imun (PTI) prin efectori, aceste molecule sunt produse ale genelor de avirulență (*Avr*). Efecorii manipulează structura și funcționarea celulei gazdă pentru a facilita infecția și pentru a declanșa un alt răspuns imun (Kamoun, 2006).

La acest nivel al interacțiunii, efectorii activează transcripția genelor, care au rol în sinteza speciilor reactive de oxigen (ROS) și îngroșarea pereților celulari (Chisholm și colab., 2006).

În cazul în care efectorul este recunoscut de către proteinele de rezistență (R) ale plantei se va activa un al doilea răspuns imun, activat de efectori (ETI-effector-triggered response), care este mult mai rapid și puternic decât PTI (Jiang și Tyler, 2012).

Interacțiunea între efector și proteinele de rezistență se desfășoară după modelul genă pentru genă și determină declanșarea răspunsului hipersensitiv (HR) și moartea programată a celulei infectate. Colapsul celulei infectate reprezintă o barieră care previne proliferarea și răspândirea patogenului în alte celule (Dénes și colab., 2015).

Interacțiunile între plantă și patogen sunt clasificate în două tipuri, pe baza rezultatului lor, se face distincția între interacțiunea compatibilă și incompatibilă. În cazul interacțiunii compatibile, patogenul inhibă imunitatea bazală și secundară a plantei, infecția devine sistemică. În schimb, în cazul interacțiunii incompatibile, recunoașterea patogenului de către

producții genelor de rezistență, declanșează activarea răspunsului ETI, care are ca rezultat inhibarea răspândirii patogenului (Gyetvai și colab., 2012).

Rolul speciilor reactive de oxigen (ROS) în răspunsul de apărare a plantei

Promptitudinea activării sistemului imunitar al plantei în momentul infecției are rol major în rezultatul interacțiunii. Reacția oxidativă, este cel mai rapid răspuns imun al plantei în urma infecției și se manifestă prin acumularea rapidă a speciilor reactive de oxigen (ROS) (Wojtaszek, 1997; Torres, 2010). Aceste molecule au rol dual fiind citotoxice, interacționează direct cu patogenul și îndeplinesc rolul de mesager secundar în activarea căilor de semnalizare. (Torres și colab., 2006).

În timpul reacției oxidative, se produc în cea mai mare cantitate moleculele de apă oxigenată și superoxid. În funcție de tipul de interacțiune, sinteza apei oxigene prezintă diferențe în timpul apariției, în ceea ce privește durata și intensitatea sintezei.

O acumulare rapidă a apei oxigenate este prezentă la interacțiunea compatibilă spre deosebire de interacțiunea incompatibilă, unde, după prima acumulare apare și a doua care durează mai mult (Apel și Hirt, 2004).

Moleculele ROS fiind citotoxice interacționează nu numai cu patogenul ci și cu moleculele celulei gazdă rezultând schimbări ireversibile și în final moartea celulei.

I.3. Hibridarea somatică și stabilitatea genetică a hibrizilor obținuți

Hibridarea somatică reprezintă o alternativă pentru speciile la care prin încrucișare naturală nu produc un zigot viabil. Prin această metodă a devenit posibilă obținerea hibrizilor intraspecifici în timp scurt și fără folosirea speciilor intermediare.

Rolul hibridării, în cele mai multe cazuri, este crearea de noi genotipuri rezistente la boli și tolerante la stresul abiotic.

Avantajul major al acestei metode, reprezintă capacitatea de a putea transfera caractere noi determinate de mai multe gene la plantele de interes (Glimelius și colab., 1999; Waara și Glimelius, 1995; Grosser și colab., 2000). În loc de a izola și clona gena de interes, prin hibridare somatică se poate transfera tot genomul unei plante.

Producții de fuziune obținuți în urma hibridării somatice, trebuie analizați deoarece numai 10 % conțin caracteristicile dorite. Caracterele nedorite ale hibrizilor provenite de la

specia sălbatică de obicei sunt eliminate prin încrucișarea hibridului cu un soi bine caracterizat. Prin încrucișări repetate, în descendenți scade proporția caracterelor nedorite.

Analiza produșilor de fuziune începe cu determinarea statutului de hibrid și nivelului de ploidie. Există numeroase metode directe sau indirecte, pentru a determina nivelul de ploidie al plantelor. Printre aceste metode, numărarea cloroplastelor din celulele stomatice, reprezintă metoda cea mai simplă și cea mai des folosită la plante încă din anul 1930 (Kostoff, 1938). În cazul hibridilor somatici aceasta metodă a fost mai rar aplicată, deși este foarte simplă și puțin costisitoare.

Analiza hibridilor prin citometria în flux este o altă metodă des folosită, datorită rapidității și exactității măsurătorilor (Doležel și colab., 2007). Numărarea directă a cromozomilor din celule, reprezintă metoda directă care comparativ cu metodele indirecte durează mai mult timp din cauza obținerii preparatelor și a analizei acestora.

În timpul regenerării, hibridii somatici pot să piardă cromozomi, această asimetrizare este spontană și imprevizibilă și probabil este rezultatul fenomenului de incompatibilitate somatică.

Mecanismele care sunt implicate în acest fenomen, sunt puțin studiate, unele studii susțin că relația filogenetică între speciile parentale este cauza cea mai importantă (Glimelius și colab., 1991, Rákósy-Tican, 2005).

Incompatibilitatea somatică este un fenomen intercelular rezultat în urma coexistenței, forțate a nucleelor și citoplasmelor de origine diferită, care în mod natural niciodată nu formează o celulă (Rákósy-Tican, 2005).

Știind faptul că acest fenomen poate să apară, este importantă repetarea analizei ploidiei plantelor după un timp mai îndelungat după hibridare. Este de asemenea importantă alegerea metodei celei mai potrivite, atât sub aspectul costurilor implicate cât și a preciziei rezultatelor obținute.

Prin metodele moderne de citogenetică, avem posibilitatea de a analiza morfologia cromozomilor, de a cariotipa genomul unei specii și de a dezvălui originea cromozomilor străini (Gavrilenko, 2007, Benavente și colab., 2008). Înainte de a începe analizele citogenetice este recomandată studierea tipului genomurilor și relația filogenetică a speciilor studiate.

Speciile din genul *Solanum* au cromozomi mici și puțini diferențiați, din acest motiv identificarea lor prin metode clasice de bandare este extrem de dificilă (Iovene și colab., 2007; Pendinen și colab., 2012). Specia sălbatică *Solanum bulbocastanum* este o specie diploidă, ($x=12$ cromozomi,) având formula A^bA^b .

Metoda de hibridizare multicoloră *in situ* a genomurilor (multicolor genomic *in situ* hybridization, mcGISH) marchează cu culori diferite cromozomii parentali, astfel devine posibilă numărarea cromozomilor parentali. Proba folosită la hibridizare constă din ADN-ul genomic total de la o specie parentală (Devi și colab., 2005; Brammer și colab., 2013).

Luând în considerare caracteristicile avantajoase ale hibrizilor somatici, aceste plante reprezintă un material valoros pentru biologia fundamentală și pentru programele de ameliorare. Caracterizarea lor moleculară, biochimică și fenotipică este esențială înainte de introducerea lor în programele de ameliorare.

I.4. Stresul hidric

Seceta este cel mai dăunător stress abiotic, care limitează creșterea și dezvoltarea plantei. Absența apei în plantă, apare când rata transpirației depășește rata apei prelevate. Pentru a preveni această situație plantele au dezvoltat mai multe mecanisme (Fleisher și colab., 2015).

Cartoful este o plantă sensibilă la stresul hidric, care are impact major în scăderea producției (Fleisher și colab., 2015). Sensibilitatea cartofului la absența apei se datorează sistemului rădicular pentru că 85% din rădăcini sunt concentrate în stratul superficial al solului (0.3 m) (Costa și colab., 2007; Sprenger și colab., 2015).

Identificarea genotipurilor tolerante la secetă necesită timp, spațiu și echipamente adecvate și se termină prin testarea plantelor în câmp. În acest ultim stadiu al cercetării un dezavantaj major îl reprezintă efectul factorilor incontrollabili. Din aceste motive, multe cercetări pentru identificarea genotipurilor tolerante la secetă încep cu preselecția în condiții *in vitro*, folosind agenți chimici pentru a reduce potențialul hidric în mediul de cultură. Cea mai folosită substanță este polietilen glicolul (PEG), care are o serie de caracteristici avantajoase, de exemplu PEG cu masa moleculară mai mare de 6000, nu intră în celulă (Gopal și Iwama, 2007). După preselecția plantelor în condiții *in vitro*, urmează selecția în seră.

Prin utilizarea platformelor de fenotipare modernă a devenit posibilă înregistrarea caracterelor morfologice ale plantelor. Această metodă este folosită cu succes în selectarea plantelor tolerante la secetă (Granier și Vile, 2014).

Platformele de fenotipare sunt dotate cu echipamente care permit măsurători multiple în timp scurt, astfel devenind posibilă urmărirea schimbărilor caracterelor morfologice în prezența unui stres biotic sau abiotic [1]. Folosirea sistemelor automate semi-automate permit

analiza unei număr mai mare de plante, metodele folosite nu sunt laborioase și nu afectează dezvoltarea plantei.

Analiza imaginilor prelevate se desfășoară cu ajutorul unui program prin urmare se obțin mult mai repede rezultate decât în cazul prelucrării manuale a datelor. În cele mai multe cercetări efectuate în platforme de fenotipare, se urmărește acumularea biomasei plantelor, prin numărarea pixelilor verzi pe imaginile preluate cu camera RGB (Fehér-Juhász și colab., 2014).

Seceta, stresul salin și temperatura înaltă sunt factori majori care limitează procesul de fotosinteză al plantelor. Limitarea poate să fie stomatală sau prin căi non-stomatale (Ashraf și Harris, 2013). În procesul de fotosinteză, captarea luminii este reacția cea mai sensibilă la factorii de stres. Prin măsurarea fluorescenței clorofilelor a devenit posibilă obținerea informațiilor referitoare la funcționarea acestui proces (Maxwell și Johnson, 2000). Măsurarea fluorescenței este o metodă non-invazivă și reproductibilă, care se poate realiza cu ajutorul fluorimetrelor portabile devenind astfel posibilă efectuarea măsurătorilor chiar și în câmp.

Metodele enumerate ajută la obținerea caracterizării complexe a plantelor. Informațiile obținute sunt utile pentru cercetările asupra fiziologiei stresului la plante și în programele de ameliorare (Fehér-Juhász și colab., 2014).

I.5. Hibrizii somatici între *Solanum tuberosum* și *Solanum bulbocastanum*, folosiți în această teză

Ameliorarea tradițională a plantelor durează mult timp, izolarea și clonarea genelor de rezistență în plantele cultivate poate să reprezinte o soluție, dar în Europa nu este acceptată cultivarea plantelor modificate genetic pentru consum uman [2].

Pentru a accelera procesul de ameliorare Rákosy-Tican și colab., (2015) au efectuat hibridarea somatică a cartofului cultivat cu specia sălbatică *Solanum bulbocastanum* (GLKS-31741, blb41), care nu se pot încruși pe cale naturală. Linia provenită de la specia sălbatică are două gene de rezistență, *Rpi-blb1* și *Rpi-blb3*, care conferă rezistență cu spectru larg la boala mana târzie. Cartoful cultivat a fost reprezentat de soiul Delikat, care este sensibil, dar este un soi german cunoscut pentru producție înaltă și de calitate.

Scopul principal al hibridării l-a reprezentat transferarea genelor de rezistență la mana târzie de la specia sălbatică la cartof în cel mai scurt timp. Hibridi obținuți cu această tehnică nu sunt considerați organisme modificate genetic (OMG). O parte a acestor hibridi somatici și descendenții lor, obținuți de Ramona Thieme (Julius Kuhn Institute, Germania) și Elena Rakosy-Tican sunt plantele folosite în experimentele noastre.

Hibridarea somatică s-a efectuat prin electrofuziunea protoplastelor, în urma căreia au fost regenerați 235 de hibridi. Majoritatea hibridilor au fost analizați cu markeri moleculari (SSR) și prin citometrie în flux, pentru a investiga natura hibridilor și nivelul de ploidie. După prima selecție au fost păstrate doar plantele hexaploide pentru cultivarea și testarea lor în experimentele următoare (Rákosy-Tican și colab., 2015).

Experimentele cu acești hibridi somatici, au fost continuate pentru a verifica prezența și funcționalitatea genelor de rezistență și pentru a investiga producția și calitatea tuberculilor (Rákosy-Tican și colab., *manuscris*). Testele de rezistență au fost efectuate în seră și în câmp. Prezența genelor de rezistență a fost verificată cu amorse specifice. În unele cazuri amorsele folosite nu indică prezența genelor de rezistență, dar totuși planta a fost rezistentă la testele efectuate cu *P. infestans*, în total au fost identificate șapte plante din această categorie. Aceste rezultate neașteptate sugerează că plantele ar conține alte gene de rezistență sau QTL, cărora li se datorează rezistența.

Producția hibridilor somatici este asemănătoare cu producția soiului Delikat, dar încă forma tuberculilor trebuie îmbunătățită în experimentele viitoare, cu scopul de a obține un soi corespunzător cerințelor actuale de piață.

II. Obiectivele tezei de doctorat

Caracterizarea preliminară a hibridilor somatici prezentată în capitolul I.5 a demonstrat că aceste plante conțin caractere valoroase. Pentru a completa informațiile referitoare la acești hibridi, s-au ales o parte dintre aceștia, pentru a fi analizați în continuare. Alegerea hibridilor și descendenților acestora a urmărit lămurirea unor aspecte care fac obiectul cercetărilor originale expuse în teza de față. Astfel, s-au urmărit următoarele obiective:

- Investigarea stabilității genetice a hibridilor somatici;

- Urmărirea prezenței cromozomilor proveniți de la *Solanum bulbocastanum* în descendenți pentru a investiga eficiența transferului de caractere folosind metode de citogenetică moleculară;
- Analiza modelului reacției oxidative în hibridi care sunt diferiți din punct de vedere genetic, pentru a înțelege interacțiunea dintre efectori și gene de rezistență corespunzătoare;
- Analiza rolului speciilor reactive de oxigen implicate în reacția oxidativă;
- Preselecția și caracterizarea hibridilor somatici toleranți la stresul hidric;

Rezultatele obținute în urma acestor cercetări completează rezultatele anterioare și asigură noi informații pentru a selecta hibridi cei mai buni pentru programele de pre-ameliorare.

III. Materiale și metode

Subiectul cercetării reprezintă caracterizarea hibridilor somatici obținuți prin electrofuziunea cartofului cultivat cu *Solanum bulbocastanum* (Rákosy-Tican și colab., 2015) și a descendenților acestora. Descendenții au fost obținuți în urma încrucișării hibridilor (SH) cu un alt soi de cartof (plante din generația primei retroîncrucișări BC1 și generația a celei de a doua retroîncrucișări BC2) (Tabel 1).

Table 1. Hibridii somatici și descendenții folosiți în acest studiu

Nume		Nume	
<i>Solanum bulbocastanum</i>	linia parentală	2295/1	SH
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Delikat	linia parentală	2295/1/7	BC1
2299/2	SH	2295/1/4/11	BC2
2284/5	SH	2295/1/4/59	BC2
2284/4	SH	2282/4	SH
2283/9	SH	2282/4/4	BC1
2283/9/3	BC1	2282/4/68	BC1
2283/9/27	BC1	2282/4/68/22	BC2
2283/9/63	BC1	2294/5	SH
2282/9/64	BC1	2294/5/5	BC1

III.1. Determinarea nivelului de ploidie a hibrizilor somatici

Pentru determinarea gradului de ploidie am ales să comparăm mai multe metode, atât directe cât și indirecte, pentru a stabili măsura în care una sau alta dintre ele se pretează mai bine scopului urmărit, analiza ploidiei unor hibrizi somatici. Am dorit, astfel, să oferim metode alternative, în funcție de costurile implicate, simplitatea metodei sau posibilitățile din diverse laboratoare.

III.1.1. Determinarea nivelului de ploidie prin citometrie în flux

În acest experiment s-au folosit primele frunze ale plantelor de 8 săptămâni, crescute în condiții *in vitro*. Pentru izolarea nucleelor s-au folosit 800 μ L din soluția tampon LB. Pentru colorarea ADN-ului s-a folosit 1 μ g/mg iodura de propidiu (PI). Măsurătorile au fost efectuate cu ajutorul aparatului Becton Dickinson FacScan citometru în flux, datele obținute au fost analizate cu programul Cell Quest în laboratorul de la Institutul Acamiei Maghiare din Martonvásár, Ungaria.

III.1.2. Determinarea nivelului de ploidie prin numărarea cloroplastelor în celulele stomatice.

Primele trei frunze bine dezvoltate pornind de vârful plantelor, au fost folosite pentru determinarea numărului cloroplastelor în celulele stomatice din epiderma abaxială, folosind 3 plante diferite și (trei perechi de celule stomatice/frunză). Numărarea a fost făcută cu ajutorul unui microscop cu fluorescență UV (Olympus BX 60).

III.1.3. Determinarea nivelului de ploidie prin numărarea cromozomilor

Vârfurile de rădăcini aproximativ 1-2 cm, de la plantele crescute *in vitro* au fost fixate în etanol/acid acetic (3:1) și păstrate în etanol 70% la temperatura 4° C. Înainte de strivirea lor, au fost tratate cu soluție de pectinază (20%). Cromozomi au fost colorați cu 4'6 diamidino-2-fenil-indol (DAPI) și plasate în soluția de fixare Vectashield (Vector Laboratories). În total au fost numărați cromozomii din cel puțin 5 celule aflate în mitoză. Observațiile au fost făcute cu ajutorul microscopului de fluorescență UV (Olympus BX 60).

III.2. Caracterizarea citogenetică a compoziției genomului plantelor studiate

Prin metoda de hibridizare *in situ* a genomurilor a devenit posibilă studierea constituției genomurilor și detectarea secvențelor recombinante. Pentru a obține rezultate bune este nevoie de un preparat cromozomial de calitate și ADN genomic pur, de la speciile parentale. ADN-ul speciilor parentale a fost folosit ca și probă în această reacție.

Principalele etape ale metodelor:

1. Extracția ADN-ului genomic

Pentru extracția ADN-ului genomic a fost folosită metoda CTAB.

1. Colorarea ADN-ului genomic

Colorarea ADN-ului genomic, a fost făcută după protocolul kitului folosit, (Nick Translation Mix (Roche)). Această metodă necesită activitatea simultană a două enzime DNase I și DNA Pol I. Pentru a obține rezultate bune lungimea ADN-ului marcat a fost verificată în gel de agaroză 1 % (w/v). ADN-ul marcat s-a purificat prin precipitare în etanol.

2. Obținerea preparatelor cromozomiale

Fragmentele internodale ale plantelor crescute *in vitro* au fost puse pe mediu MS, care conține 0.05 mg/l acid naftalen-acetic (ANA). După două săptămâni, rădăcinile au fost recoltate și tratate cu 8-hidroxiquinolină, pentru a crește procentul celulelor în mitoză. Rădăcinile au fost fixate cu soluția etanol:acid acetic (3:1) și păstrate la congelator -20°C până la prelucrarea lor. Înainte de obținerea preparatelor, rădăcinile au fost digerate cu pectoliaza, citohelicaza și celulaza dizolvate în soluția tampon citrat.

4. Hibridizarea *in situ* a genomurilor

Pentru hibridizarea multicoloră *in situ* a genomurilor (mcGISH) au fost folosite următoarele metode:

Protocol 1 după metoda lui Kruppa și colab., (2013) optimizat pentru cartof.

Protocol 2 după metoda lui Jang and Weiss-Schneeweiss (2015) optimizat pentru cartof.

5. Imaginistica – analiza imaginilor microscopice

Preparatele au fost analizate cu microscopul epifluorescent Axio Imager M2 (Carl Zeiss, Vienna, Austria), imaginile au fost prelevate cu camera CCD și procesate cu programul AxioVision ver. 4.8 (Carl Zeiss, Vienna, Austria).

III.3. Vizualizarea reacției oxidative

Aclimatizarea plantelor și agroinfiltrarea

Plantele au fost crescute în borcane, folosind mediul RMB5, timp de 10 zile, după care au fost transferate în ghivece de plastic (10x10x12 cm) și crescute în camera de creștere (Binder KBWF 720 E5.2), folosind următoarele condiții de creștere 16h/8h lumină/întuneric și umiditatea 70 %. Pentru a verifica funcționalitatea genelor de rezistență, hibrizi somatici au fost clasificați în diferite grupe pe baza prezenței genelor de rezistență și a rezultatelor obținute în urma testelor de rezistență (Rákosy și colab., *manuscris*).

Etapele metodei:

1. Pregătirea culturilor bacteriene pentru agroinfiltrare

2. Agroinfiltrarea

În acest experiment au fost folosite plante de șapte săptămâni. În agroinfiltrarea s-a folosit *Agrobacterium tumefaciens* tulpina AGL1+ pVirg transformată cu plasmidul pK7WG2 care conține genele de avirulență (*Avr*) de la *Phytophthora infestans* clona izolată T30-4, PTIG_22870 care conține gena *Avr2* și clona PITG_21388, care conține gena *Avrblb1*.

3. Vizualizarea reacției oxidative

Sinteza apei oxigenate a fost detectată cu colorantul 3,3-diaminobenzidine (DAB), iar prezența superoxidului cu colorantul Nitroblue tetrazolium (NBT) folosind metoda după Asselbergh și colab., (2007).

4. Analiza imaginilor

Imaginile obținute au fost prelucrate cu ajutorul programului Adobe Photoshop, iar rezultatele au fost analizate statistic cu programul R work program.

III.4. Stres-selecția hibrizilor somatici

III.4.1. Pre-selecția hibrizilor somatici toleranți la stresul hidric

În cazul hibrizilor somatici, datorită transferului genomurilor de la două specii diferite este posibilă și combinarea caracterelor de rezistență la stres. Hibrizi somatici testați pentru rezistența la mănă târzie, au fost introduși în experimentul de preselectie a genotipurilor tolerante la secetă. Stres-selecția *in vitro* a fost executată în două etape, suplimentând mediul de creștere cu 5 % PEG respectiv 15 % PEG în a doua etapă. Durata experimentului a fost de 3 săptămâni în ambele etape.

La finalul fiecărui experiment au fost înregistrate caracteristicile morfologice (numărul și lungimea tulpinelor și a rădăcinilor) și concentrația prolinei sintetizată de către plante.

III.4.2. Acumularea de biomasă în condiții de stres hidric

Măsurătorile și analiza plantelor au fost făcute în cadrul platformei de fenotipare HAS-RSDS, din Szeged, Ungaria. Timp de șase săptămâni (Aprilie și Mai), a fost monitorizată creșterea plantelor în seră. În primul rând a fost determinat conținutul de apă al solului, pentru a determina programul de irigare și grupele, grupa de martor (conținutul de apă al solului 60%) și grupa cu stresul hidric (conținutul apă al solului 20 %). Biomasă plantelor a fost determinată prin numărarea pixelilor verzi. Datele obținute au fost prelucrate cu ajutorul programului Matlab folosind accesoriul Image Processing Toolbox (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

III.4.3. Efectul stresului hidric asupra fotosintezei

Fluorescența clorofilelor pe fața superioară a frunzei a fost măsurată cu fluorimetru cu modulație pulsatorie în amplitudine și analizor al eficienței plantelor (PEA). Am măsurat fluorescența clorofilelor la începutul și la sfârșitul perioadei stresului hidric.

IV. Rezultate și discuții

IV.1. Determinarea nivelului de ploidie cu metode directe și indirecte

Metodele directe și indirecte au fost folosite cu succes în determinarea nivelului de ploidie al hibrizilor somatici.

IV.1.1. Nivelul de ploidie determinat prin citometrie în flux

Rezultatele obținute în urma determinării, au fost comparate cu rezultate obținute după hibridare somatică (Rákosy-Tican și colab., 2015). Liniile parentale, specia diploidă *S. bulbocastanum* și cartoful cultivat tetraploid, au fost folosite pentru standardizare internă. În total au fost analizați șase hibrizi, opt plante din generația primei retroîncrușișări (BC1, backcross) și trei plante din generația a celei de a doua retroîncrușișări (BC2, backcross). Știind că în urma hibridării somatice au fost menținute numai plantele hexaploide, rezultatele obținute arată, că plantele pierd cromozomi în timpul regenerării și cultivării lor în condiții *in vitro* (Rákosy-Tican și colab., 2015).

IV.1.2. Determinarea nivelului de ploidie prin numărarea cloroplastelor din celulele stomatice

În total au fost numărate cloroplastele din 54 de celule stomatale. Corelația pozitivă între numărul cloroplastelor și nivelul de ploidie al plantelor a fost demonstrată și în cazul acestor hibrizi somatici.

IV.1.3. Determinarea nivelului de ploidie prin metoda directă

Numărul cromozomilor a fost determinat din celulele meristematice, rezultatele obținute confirmă rezultatele metodelor indirecte. În total au fost numărați cromozomi de la șapte hibrizi, zece genotipuri din generația BC1 și trei genotipuri din generația BC2. Pe baza rezultatelor obținute s-a evidențiat că hibrizii somatici pierd cromozomi iar nivelul de ploidie scade la nivelul de pentaploid și tetraploid.

Analiza numărului cromozomilor în hibrizii somatici, a evidențiat prezența hibrizilor euploizi, având un număr de cromozomi așteptați $2n=72$ (genotipurile: 2299/2, 2284/5, 2283/9, 2294/5), și aneuploizi $2n<72$ (genotipurile: 2284/4, 2295/1, 2282/4).

De asemenea, au fost obținute rezultate similare și în cazul descendenților BC1, din zece plante analizate, numai două genotipuri au avut numărul de cromozomi așteptați $2n=60$ (2283/9/63; 2295/1/3), restul genotipurilor au avut mai puțini cromozomi $2n<60$.

Rezultatele neașteptate sunt prezente în generația BC2, dintre cele trei genotipuri analizate, unul are mai mulți cromozomi decât numărul așteptat ($2n=60$). Prezența mai multor cromozomi decât numărul așteptat, sugerează prezența problemelor la separarea cromozomilor în meioză.

Prin aceste analize, a fost evidențiat faptul că hibridii somatici pierd cromozomi și astfel nu sunt stabili din punct de vedere genetic. Eliminarea cromozomilor este un fenomen raportat în cazul mai multor hibridi somatici (Harms, 1983; Menke și colab., 1996; Pijnacker și colab., 1989; Gavrilenco și colab., 2002; 2003). Cauza eliminărilor poate să fie reprezentată de incompatibilitatea somatică. Acest fenomen are mecanisme asemănătoare cu incompatibilitatea sexuală.

IV.1.4. Corelația între metodele directe și indirecte în determinarea nivelului de ploidie

Rezultatele numărării cromozomilor au fost folosite pentru a stabili, din punct de vedere statistic, care dintre metodele indirecte prezice mai corect numărul real al cromozomilor. În primul rând a fost confirmată prezența corelației pozitive între numărul real al cromozomilor și numărul calculat pe baza rezultatelor obținute prin metode indirecte ($p<0.05$).

În partea a doua a analizelor statistice s-a calculat numărul cromozomilor pe baza metodelor indirecte, utilizând o ecuație lineară. Rezultatele indică faptul că ambele metode indirecte, citometrie în flux ($R^2= 0.78$, $p<0.05$) și numărul cloroplastelor per celulă stomatică ($R^2=0.85$, $p<0.05$) poate să prezică numărul cromozomilor cu mare precizie (Figura 1).

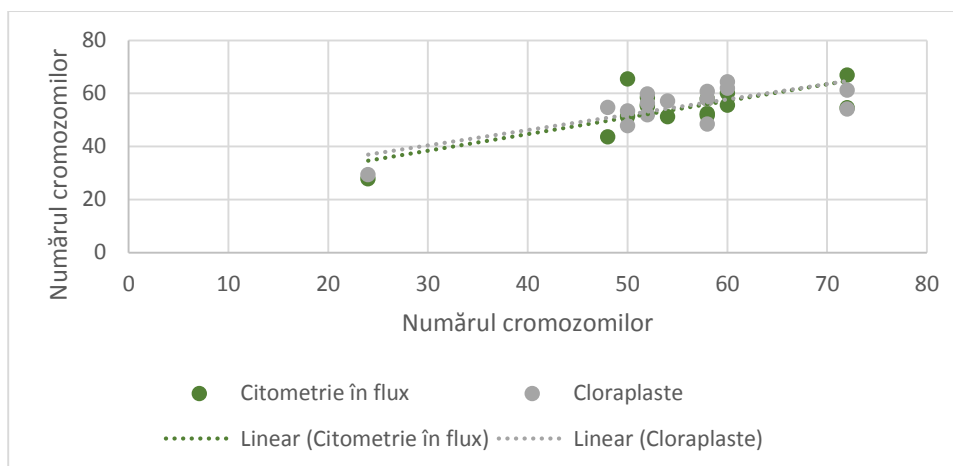


Figura 1. Corelația între numărul real al cromozomilor și numărul determinat după numărarea cloroplastelor (puncte verzi) și numărul determinat după rezultatele citometriei în flux (puncte gri)

IV.2. Caracterizarea citogenetică a compoziției genomurilor hibrizilor somatici

IV.2.1. Compoziția genomului și constituția cromozomială a hibrizilor somatici

La analiza nivelului de ploidie a hibrizilor și descendenților a fost identificată prezența fenomenului de incompatibilitate somatică între speciile parentale, ceea ce cauzează pierderea cromozomilor (Orczyk și colab., 2003).

Pentru a investiga compoziția genomului și constituția cromozomială a hibrizilor somatici am folosit tehnica de hibridizare multicoloră *in situ* a genomurilor (mcGISH). Din rezultatele preliminare știm că doar hibrizii hexaploizi au fost selectați pentru menținere și cultivare *in vitro* (Rákosy-Tican și colab., 2015).

Rezultatele obținute au confirmat rezultatele examinării nivelului de ploidie, plantele au pierdut cromozomi pe timpul cultivării *in vitro*. În total au fost analizați cinci hibrizi somatici, cinci plante din generația BC1 și două genotipuri din generația BC2. Prin această metodă a devenit posibilă urmărirea pierderilor cromozomilor din seria ce conține hibrid-BC1-BC2.

Prima serie studiată demonstrează, că hibridul hexaploid (2295/1) a devenit aneuploid pe perioada de menținere *in vitro*. După regenerare a avut 72 de cromozomi, iar acum are 66 de cromozomi, dintre care 46 provin de la cartoful cultivat (*tbr*), iar 20 de la *S. bulbocastanum* (*blb*) (Figure 2A). În generația BC1, este de așteptat să avem 60 de cromozomi, dar în acest

genotip avem numai 58 de cromozomi, 48 de la cartoful cultivat și numai 10 de la specia sălbatică (Figura 2 B).

Genotipurile din generația BC2 demonstrează foarte bine faptul că dacă două genotipuri au același număr de cromozomi, nu înseamnă că sunt uniforme din punct de vedere genetic. Fiecare genotip studiat are în total 50 de cromozomi, dar diferă proporția de la speciile parentale (Figura 2 C și D)

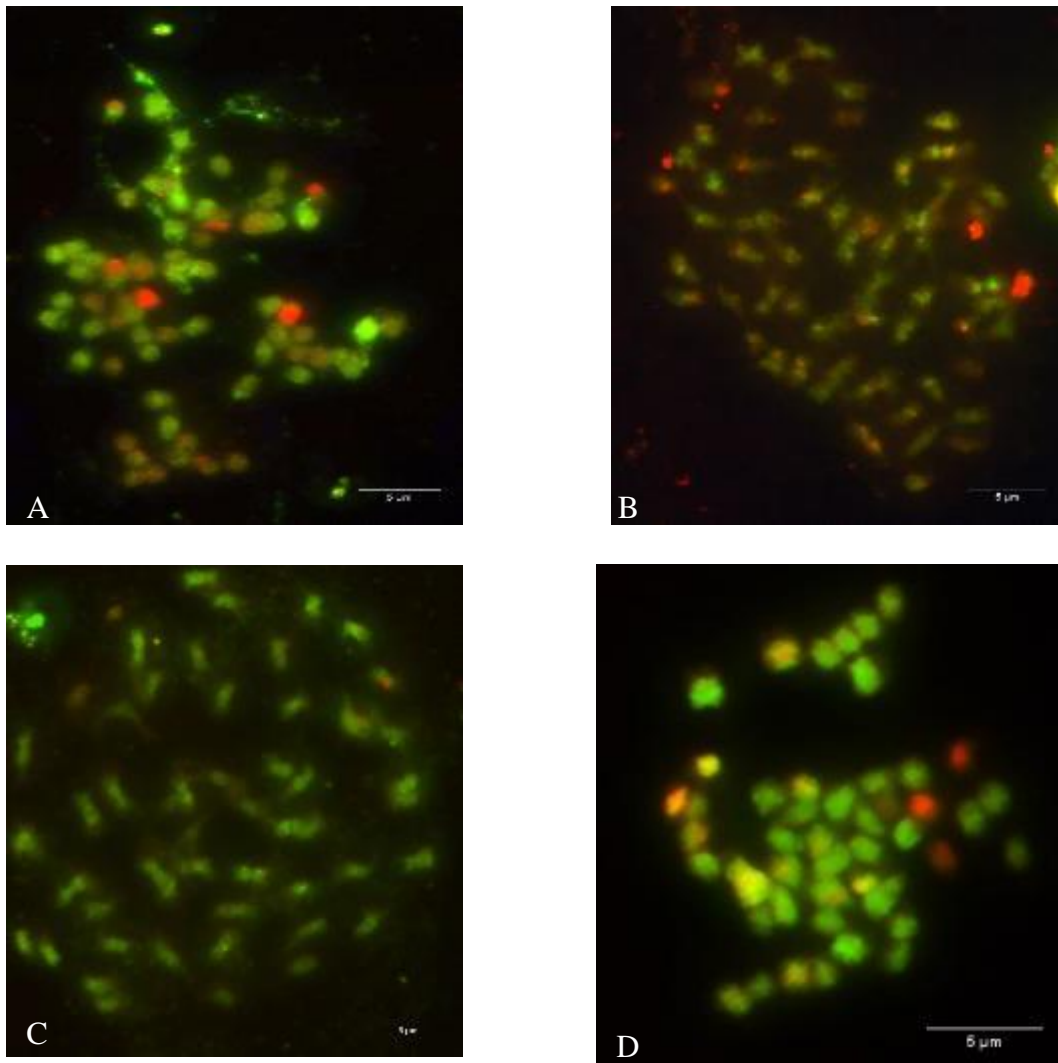


Figura 2. Vizualizarea prin tehnica mcGISH a cromozomilor aflați în metafaza mitozei în seria hibrid-BC1-BC2

A-2295/1 are în total 66 de cromozomi: 46 tbr (verde) și 20 blb (roșu); B-2295/1/7 are în total 58 de cromozomi: 48 tbr (verde) și 10 blb (roșu) C-2295/1/4/11 are în total 50 de cromozomi: 48 tbr (verde) și 2 blb (roșu) D-2295/1/4/59 are în total 50 de cromozomi: 42 tbr (verde) și 8 blb (roșu)

Trei genotipuri din generația BC1 (2283/9/3; 2283/9/27; 2283/9/63) obținute în urma încrucișării cartofului cultivat cu hibridul hexaploid (2283/9) au număr diferit de cromozomi, ce demonstrează că eliminarea cromozomilor este un proces aleator. Dintre aceste genotipuri, numai un genotip are numărul de cromozomi (60 de cromozomi) conform așteptărilor (Figura 3).

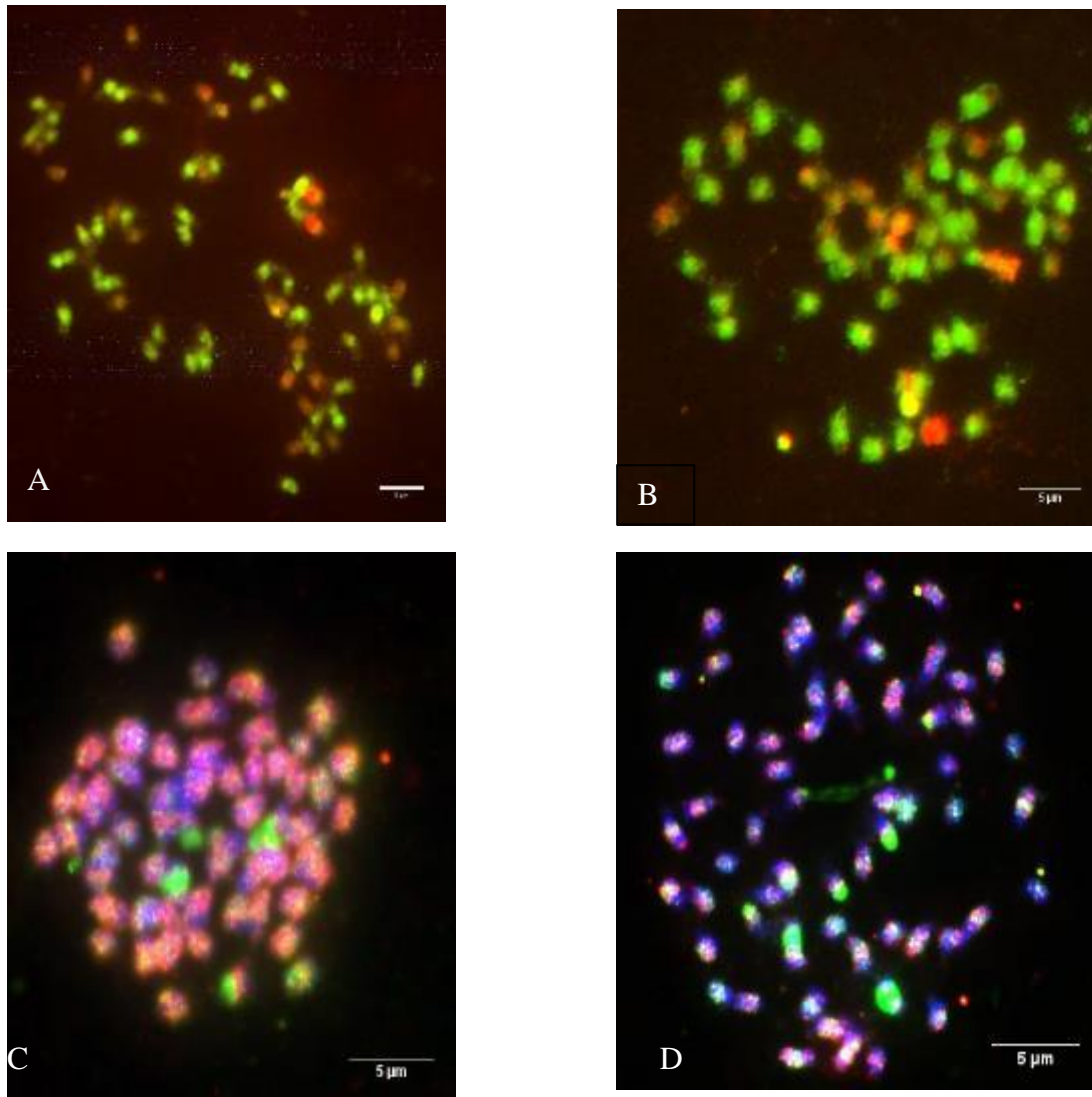


Figura 3. Vizualizarea cromozomilor aflați în metafaza mitozei într-o serie hibrid-BC1-BC2 prin tehnica mcGISH

A-2283/9 genotip hexaploid cu 48 tbr (verde) și 24 blb (roșu); **B**-2283/9/3 având 52 de cromozomi, 40 tbr (verde) și 12 blb (roșu) **C**-2283/9/27 având 52 de cromozomi, 44 tbr (roșu) și 8 blb (verde) **D**-2283/9/63 având 60 de cromozomi, 44 tbr (roșu) și 16 blb (verde);

Prin analiza compoziției cromozomilor a fost evidențiat faptul că, dacă genotipurile au numărul așteptat de cromozomi, proporția speciilor parentale poate să prezinte numere neașteptate. Un exemplu foarte bun este reprezentat de genotipul 2283/9/63, care a avut 16 cromozomi de la *S. bulbocastanum*, mai mult decât numărul așteptat (Figure 3D).

Pe baza rezultatelor obținute s-a ajuns la concluzia că nivelul de ploidie al hibrizilor se stabilește la nivel tetraploid.

Prin analiza compoziției genomului la genotipul BC1-2294/5/5 a fost demonstrată prezența secvenței recombinante (Figura 4). Acest hibrid este obținut din încrucișarea cartofului cultivat cu hibridul hexaploid 2294/5.

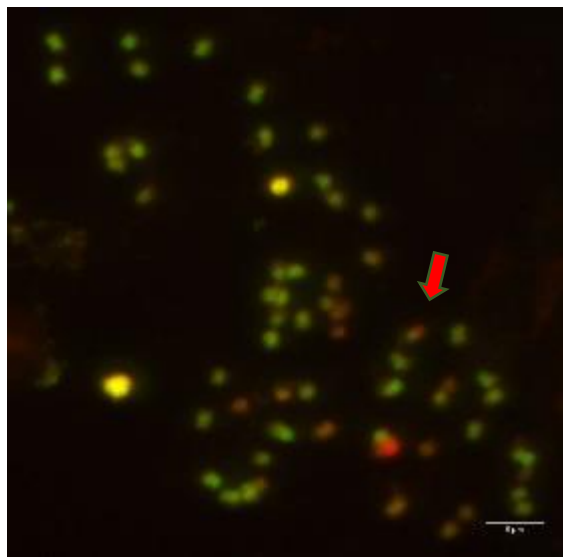


Figura 4. Vizualizarea cromozomilor aflați în metafaza mitozei la genotipul 2294/5/5 prin tehnica mcGISH. Săgeata indică locul secvenței recombinante.

-Acest genotip are în total 58 de cromozomi, din care 46 provin de la cartoful cultivat (verde) și 12 de la *S. bulbocastanum*

Cromozomii fiind așa de mici este greu de identificat recombinația secvențelor mai scurte, astfel este posibil de evidențiat numai recombinația secvențelor mai lungi (Figura 4) (Gavrilenko și colab., 2002).

Eliminarea preferențială a cromozomilor de la specia sălbatică a fost raportată în mai multe cazuri, unde partenerii de fuziune ai cartofului au fost *S. pinnatisectum* (Menke și colab., 1996), *S. phureja* (Pijnacker și colab., 1989) *S. brevidens* (Gavrilenko și colab., 2002) sau *S. etuberosum* (Gavrilenko și colab., 2003).

Din datele din literatură se știe că *S. bulbocastanum* nu se poate încrucișa în mod natural cu cartoful cultivat din cauza diferențelor apărute la nivelul ploidiei echilibrate a endospermului (EBN, Endosperm Balance Number) (Rákosy-Tican și colab., 2005). Cartoful cultivat are 2EBN iar specia sălbatică 1EBN chiar în cazul ploidiei egale această diferență provoacă probleme în dezvoltarea zigotului (Masuelli și Camadro, 1997).

În toate genotipurile studiate două perechi de cromozomi prezintă un semnal foarte puternic, care este localizat în regiunea centromerului. Stupar și colab., (2002) au identificat o secvență repetitivă 2D8 ca și sursă a semnalului.

Evenimentul de recombinare este esențial atunci când scopul proiectului este de a transfera caracterele dorite de la specia sălbatică în cartoful cultivat. Pe baza rezultatelor obținute am demonstrat că hibrizi între cartoful cultivat și *S. bulbocastanum* au în genomul lor cromozomi proveniți de la specia sălbatică prin urmare sunt candidați buni pentru programe de ameliorare.

IV.3. Vizualizarea reacției oxidative

Metodele histochimice permit detectarea, localizarea moleculelor ROS și monitorizarea sintezei și a evoluției după interacțiunea efectorului cu gena de rezistență (Kuźniak și colab., 2014).

IV.3.1. Detectarea apei oxigenate

Prin folosirea colorării specifice am reușit să identificăm locul de sinteză al apei oxigenate. Martorul negativ, reprezentat de infiltrarea cu apă, nu a prezentat nici un semn specific. În acest experiment speciile parentale au fost folosite ca și martor al interacțiunii compatibile respectiv incompatibile, pentru că *S. tuberosum* cv. Delikat este sensibil iar *S. bulbocastanum* rezistent la mana târzie.

Modelul sintezei apei oxigenate la hibridii somatici a fost comparat cu modelul obținut la speciile parentale, fiecare comparație a fost verificată statistic cu ajutorul unui model linear (LM), care a folosit grupurile de plante, timpul trecut după infecție și mărimea ariei de sinteză.

Testele statistice au demonstrat prezența diferenței semnificative între modelul de sinteză al apei oxigenate prezent în cazul interacțiunii compatibile și al celei incompatibile. Aria de sinteză a apei oxigenate prezintă mari modificări la ore diferite după sinteză în cazul interacțiunii incompatibile. În această interacțiune prima reacție oxidativă apare în primele trei

ore ale infecției, iar a doua după 24 de ore. În cazul interacțiunii compatibile maximul reacției oxidative apare după numai 8 ore de la infiltrare.

Rezultatele obținute corespund cu datele din literatură (Apel și Hirt, 2004, Kobayashi și colab., 2007; Wi și colab., 2012, Han și colab., 2013) unde s-a demonstrat că în cazul interacțiunilor incompatibile după primul maxim de sinteză, apare al doilea, mai lung. Pentru a doua reacție oxidativă se folosește și denumirea de “răspuns de recunoaștere”, pentru că apare numai în cazul în care efectorul este recunoscut de către gena de rezistență.

Analiza apariției reacției oxidative la hibridii somatici a început cu hibridul somatic (2282/4/77), care conține genele de rezistență *Rpi-blb1* și *Rpi-blb3*, dar testele de rezistență au demonstrat că acest genotip este sensibil la mana târzie (Figura 5). În urma agroinfiltrării apar două maxime în sinteza apei oxigenate, dar comparativ cu *S. bulbocastnum*, ambele apar mai târziu. Cantitatea apei oxigenate nu este mai mică decât în cazul speciei sălbatice, (t-test, $p > 0.05$). Această interacțiune demonstrează importanța apariției reacției oxidative la începutul interacțiunii. Iar întârzierea primei reacții este o caracteristică a plantelor sensibile (Wi și colab., 2012).

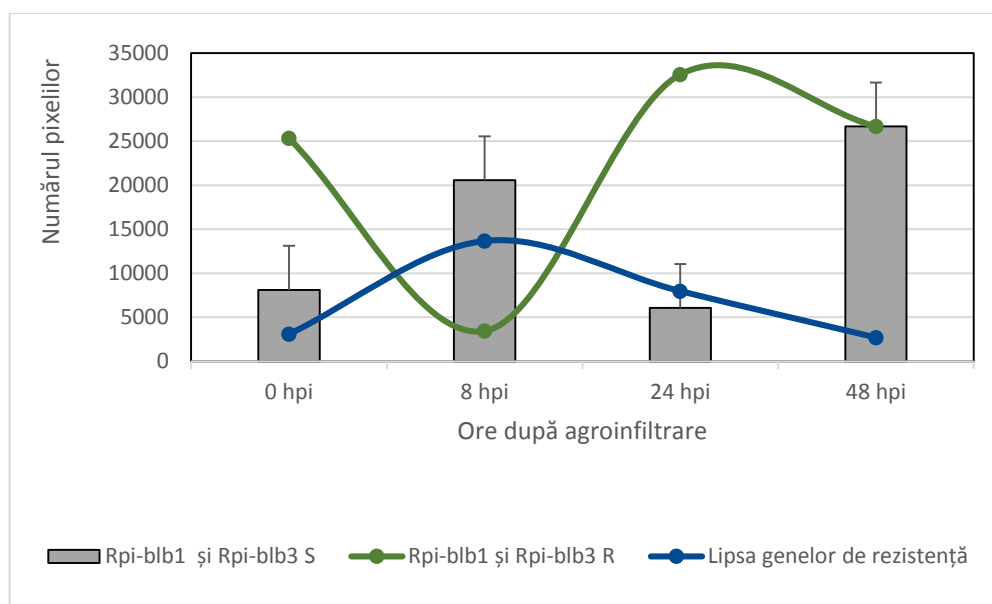


Figura 5. Sinteza apei oxigenate la hibridul sensibil la mana târzie în comparație cu modelul de sinteză la *S. bulbocastnum* (linia verde) și la *S. tuberosum* (albastru)

În a doua secțiune a experimentului am investigat răspunsul hibridilor somatici, care conțin gena *Rpi-blb1*, genotipul rezistent (2283/9/3) și genotipul sensibil (2283/9/27) la mana târzie. Modelul de sinteză al apei oxigenate la planta sensibilă corespunde cu modelul obținut

în cazul interacțiunii compatibile (LM, $p > 0.05$). Primul maxim al sintezei apare după 8 ore, după care nivelul sintezei scade până la 24 de ore după infiltrare.

Ultima etapă a experimentului reprezintă analiza hibridilor somatici, care conțin gena *Rpi-blb3*, genotipul rezistent și genotipul sensibil (2283/9/63) la mana târzie (2283/9/64). În plantele sensibile aria de sinteză a apei oxigenate este semnificativ mai mare decât în cazul genotipurilor studiate anterior (Delikat, 2282/4/77 și 2283/9/27). Inițial se sintetizează o cantitate foarte mare, după care sinteza apei oxigenate rămâne la un nivel mai scăzut. În genotipul rezistent nivelul de sinteză crește în timp de 8 ore după infecție iar a doua reacție oxidativă apare numai după 48 de ore.

Rezultate similare au găsit Polkowska-Kowalczyk și colab., (2004), prin studierea interacțiunii între *Solanum villosum* și *Phytophthora infestans*.

IV.3.2. Vizualizarea sintezei superoxidilor

Superoxidul este al doilea compus important în răspunsul hipersensibil al plantelor. Cu ajutorul reacției de culoare am reușit să evidențiem modelul sintezei superoxidului în interacțiunile compatibile și incompatibile. În plantele rezistente la mana târzie sinteza superoxidului apare în primele opt ore după infecție, iar în cazul plantelor sensibile este prezent la orice oră de verificare după infiltrare (Figura 6)





	Sensibil		Rezistent	
	0 hpi	48 hpi	0 hpi	48 hpi
1				

Figura 6. Sinteza superoxidului în plantele sensibile și plantele rezistente la mana târzie

IV.4. Stres-selecția hibrizilor somatici toleranți la secetă

Stres-selecția hibrizilor toleranți la stresul hidric reprezintă o parte importantă a programele de ameliorare. Combinarea caracterelor avantajoase într-un singur genotip este importantă, pentru ameliorarea cartofului. Experimentul nostru are două etape majore: stres-selecția *in vitro* și în seră.

IV.4.1. Pre-selecția *in vitro* a hibrizilor somatici toleranți la stresul hidric

Stresul hidric a fost indus prin folosirea compusului PEG în mediul de cultură, în concentrații diferite. În prima etapă s-a folosit în concentrație de 5 % iar în cea de-a doua etapă 15%. Pe baza caracterelor morfologice (lungimea tulpinilor și rădăcinilor), genotipurile au fost clasificate în diferite grupe. În general, pe baza rezultatelor am evidențiat, efectul negativ al stresului hidric asupra dezvoltării plantelor.

Următoarea enumerare conține caracteristicile morfologice ale fiecărei clase.

Groupa 1: plantele bine dezvoltate, cu multe tulpini și rădăcini, frunze verzi, dezvoltarea tulpinilor abaxiale și la unele genotipuri prezența mini-tuberculilor;

Groupa 2: tulpină slab dezvoltată, fără rădăcini;

Groupa 3: rădăcini dezvoltate, tulpină nedevelopată;

Groupa 4: plante uscate ;

Cartoful este o plantă sensibilă la secetă, fapt susținut și de rezultatele obținute în cadrul testelor de stres-selecție. Seceta indusă are un efect negativ asupra dezvoltării hibrizilor somatici. Comparativ cu grupul martor, la toate genotipurile studiate, plantele supuse stresului au avut o dezvoltare mai slabă.

În capitolul precedent, am demonstrat, că hibrizii somatici sunt diferiți din punct de vedere genetic, din acest motiv este importantă analiza răspunsului fiecărui genotip la stresul hidric.

Clasificarea genotipurilor pe baza caracterelor morfologice ajută la înțelegerea modului de alocarea a resurselor.

Liniile parentale folosite în hibridarea somatică, au fost incluse în grupa 3, pentru că prezintă o creștere a rădăcinilor. Prezența rădăcinilor este o caracteristică importantă, pentru că asigură absorbția rapidă a apei și recuperarea rapidă după perioada de secetă.

În cazul stresului mai sever (15 % PEG) plantele martor s-au dezvoltat normal, iar plantele stresate au avut o dezvoltare mai slabă. Folosind criteriile de clasificare anterioară, în acest caz

nici o plantă nu este încadrată în grupa 1. Sunt câteva plante care au dezvoltat tulpină laterală, membri ai grupei 2, sau rădăcini mai scurte, membrii grupei 3.

Concentrația de prolină sintetizată

Rezultatele obținute arată creșterea semnificativă a concentrației de prolină la plantele stresate în comparație cu plantele martor, în ambele etape ale experimentului (t.test, $p < 0.01$). Cantitatea de prolină sintetizată diferă în funcție de genotipuri.

IV.4.2. Acumularea biomasei proaspete în condiții de stres hidric

Platforma de fenotipare asigură o oportunitate pentru a evalua schimbarea caracterelor morfologice și fiziologice ale hibrizilor somatici în condiții de stres hidric (Wegener și colab., 2015).

În experimentul nostru am evaluat răspunsul hibrizilor la secetă, prin urmărirea acumulării biomasei verzi și a cantității de tuberculi. Determinarea biomasei verzi se face prin numărarea pixelilor verzi pe pozele RGB. După experimente am evaluat cantitatea și forma tuberculilor.

Rezultatele obținute au demonstrat, că stresul hidric are un efect negativ asupra acumulării biomasei în cazul speciilor parentale și hibrizilor somatici, cu excepția unui singur hibrid, unde plantele stresate au acumulat mai multă biomasă verde, decât martorul.

Stresul hidric scade semnificativ acumularea biomasei la cartoful cultivat (ANOVA, $p < 0.05$), dar în cazul speciei sălbatice sau a hibrizilor, plantele stresate acumulează biomasa mai încet, dar nu este diferență semnificativă între plantele stresate și martorul (ANOVA, $p > 0.05$).

La majoritatea hibrizilor somatici evaluați, este remarcabil faptul că acumularea biomasei plantelor merge paralel în plantele stresate și nestresate. Efectul negativ al stresului hidric se poate observa doar în primele două săptămâni, iar începând cu săptămâna a treia plantele stresate încep să crească la fel ca și martorul (Figura 7A). În cazul genotipului 2283/9 este interesant, faptul că până la finalul experimentului planta stresată acumulează o biomasă verde mai mare decât martorul (Figura 7B).

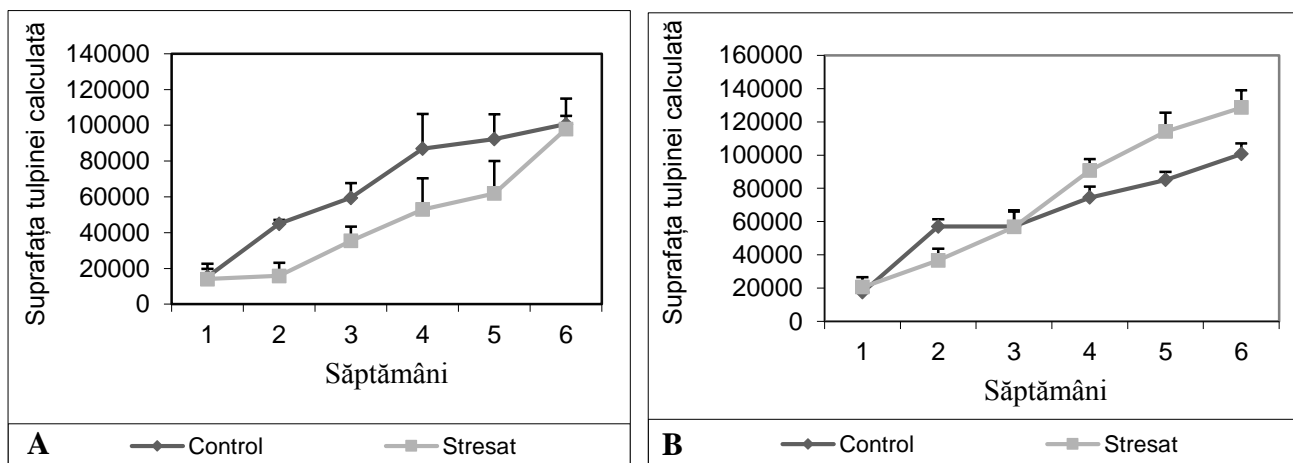


Figura 7. Acumularea biomasei verzi a genotipurilor 2282/4 (A) și 2283/9 (B)

Cantitatea și calitatea tuberculilor este un alt caracter urmărit în programele de ameliorarea a cartofului.

Rezultatele obținute în urma măsurării cantității tuberculilor a evidențiat că stresul hidric are un efect negativ asupra dezvoltării tuberculilor pentru că scade semnificativ cantitatea tuberculilor la plantele stresate (T-test, $p < 0.01$), excepție face numai un singur genotip din generația BC1, unde planta stresată produce o cantitate mai mare de tuberculi decât martorul.

În toate genotipurile studiate, forma tuberculilor este similară cu tuberculii soiului Delikat. Tuberculii au coaja albă, formă rotundă și suprafață netedă (Figura 8).



Figura 8. Forma tuberculilor la hibridul 2283/9 în condiții martor (A) și în condiții de stres (B)

Rezultatele obținute evidențiază faptul că biomasa verde a plantelor, precum și cantitatea tuberculilor sunt indicatori corespunzători pentru analiza efectului stresului hidric.

IV.4.3. Efectul stresului hidric asupra fotosintezei

Fotosinteza este un proces sensibil, prezența factorilor de stres biotic și abiotic conduce la apariția deviațiilor în procesul normal și din acest motiv funcționarea sistemului fotosintetic poate fi folosită ca un indicator al fitnessului plantei.

În experimentul nostru executat pe platforma de fenotipare, am măsurat de două ori funcționalitatea procesului fotosintezei pentru a evidenția efectul stresului hidric asupra complexelor proteice, care au rol în capturarea lumini și transformarea în energie biochimică. În primul rând am evaluat schimbarea parametrilor care reflectă funcționarea întregului sistem.

Schimbarea randamentului cuantic potențial (F_v/F_m) a fost verificată deoarece, acest parametru reflectă funcționarea fotosistemului II (PSII). În cazul de față, la plantele aflate atât în condiții martor cât și în condiții de stres hidric valoarea acestui parametru corespunde valorii măsurate la plantele nestresate 0.7-0.84 (Jefferies 1992; Baker și Rosenqvist, 2004; Rolfe și Scholes, 2010). Mai multe studii raportează insensibilitatea acestui parametru la stresul hidric. În cadrul studiului nostru nu s-a observat nici o diferență semnificativă între plantele stresate și nestresate, dimpotrivă în cazul unor genotipuri, plantele stresate au obținut valori mai mari decât martorul.

În etapa următoare am investigat randamentul cuantic efectiv (F_v'/F_m'), acest parametru reflectă eficiența transportului de electroni și transformarea energiei luminoase în energie biochimică (Maxwell și Johnson, 2000; Brestic și Zivcak, 2015).

Rezultatele obținute corespund cu rezultatele din literatură, randamentul cuantic efectiv este sensibil la stresul hidric. Măsurătorile efectuate la începutul experimentului nu prezintă nici o diferență între plantele stresate și martor, dar rezultatele de la a doua măsurătoare arată o scădere semnificativă în randamentul cuantic efectiv al plantelor stresate. Flagella și colab., (1998) au demonstrat că stresul hidric slab și moderat nu afectează randamentul cuantic al PSII, doar ciclul Calvin (Brestic și Zivcak, 2015).

În următoarea etapă a experimentului, am investigat funcționarea complexelor proteice. În primul rând am determinat efectul stresului hidric asupra activității complexului de scindare a apei al fotosistemului PSII (Water splitting complex/ Oxygen-evolving complex) prin folosirea formulei F_v/F_o . Rezultatele obținute arată, că activitatea acestui complex este afectată negativ la începutul stresului hidric, dar acest efect negativ dispare până la sfârșitul experimentului (t.test $p > 0.05$).

În etapa următoare am determinat fluorescența și dimensiunea plastoquinonelor ($F_v/2$). Rezultatele obținute corespund așteptărilor, ambii parametri au avut o creștere semnificativă la plantele stresate.

Există o corelație pozitivă între raportul $F_v/2$ și numărul pigmentilor asociați cu centrele de reacție. Pe baza rezultatelor obținute, putem concluziona faptul că pigmentii se acumulează în număr mai mare în jurul centrelor la plantele stresate (Fodorpataki, 2004). În plus, prin determinarea densității centrelor active în fotosinteză, am evidențiat că numărul acestora crește semnificativ la plantele stresate.

Prin calcularea indexului de performanță (PI) s-a demonstrat că activitatea fotosistemelor I și II a fost mai crescută la a doua măsurare, față de rezultatele primei măsurători.

Energia nettransformată în energie biochimică este re-emisă ca fluorescență sau risipită sub formă de căldură. Această parte a energiei a fost determinată prin calcularea parametrului NPQ (Non-Photochemical Quenching) (Demming și Adams, 1996; Maxwell și Johnson, 2000). Rezultatele obținute arată că risipirea energiei a scăzut cu trecerea timpului, de la prima măsurare până la a doua.

Rata transportului de electroni (Electron transport rate, ETR) arată diferențe între plantele martor și plantele stresate la toate genotipurile. La martor ETR devine saturat la un nivel scăzut al densității fluxului fonic fotosintetic (Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD)). Similar cu rezultatele noastre, Li și colaboratori (2015) au evidențiat că plantele tolerante la secetă au capacitate crescută ETR.

Un alt factor, care poate să determine stabilitatea fotosintezei este reprezentat de prezența tuberculilor, deoarece aceștia sunt un depozit non-fotosintetic (Basu și colab., 2014).

Cu ajutorul acestor parametri am evidențiat stabilitatea fotosintezei în hibridii somatici și capacitatea plantelor de a se adapta la stresul hidric moderat. Stres-selecția hibridilor somatici trebuie continuată cu testarea lor în câmp, pentru a identifica candidații cei mai buni pentru programele de ameliorare.

V. Concluzii generale și originalitatea tezei

Obiectivul principal al acestei lucrări reprezintă caracterizarea complexă a hibrizilor somatici între cartoful cultivat și *S. bulbocastanum* și a descendenților pentru a completa rezultatele preliminare și pentru a oferi noi informații legate de rolul reacției oxidative în interacțiunea plantei cu efectorii specifici și toleranța plantelor la stresul hidric.

In concluzie:

1. S-a reușit investigarea stabilității genetice a hibrizilor somatici și descendenților acestora, rezultați prin retroîncrucișare BC1, BC2.. Din rezultatele preliminare se știe, că numai plantele hexaploide au fost menținute pentru cultivare *in vitro*. Rezultatele noastre demonstrează, că hibridii somatici nu sunt stabili din punct de vedere genetic, au pierdut cromozomi în timpul cultivării. Incompatibilitatea somatică poate să fie cauza eliminării cromozomilor. Numărul diferit de cromozomi în genotipurile din generația BC1, proveniți din același eveniment de încrucișare demonstrează, că numărul cromozomilor pierduți este imprevizibil. Pe baza rezultatelor obținute cu metode indirecte este posibilă calcularea numărului cromozomilor cu mare precizie.

2. Compoziția genomului hibrizilor somatici a fost investigată cu ajutorul metodei citogenetice de hibridizare multicoloră *in situ* a genomurilor (mcGISH). Pe baza rezultatelor obținute, recomandăm folosirea unui pre-tratament pentru vârfurile rădăcinilor, cu enzimele pectinaza, celulza și citohelicaza pentru a obține un preparat cromozomial fără citoplasmă. Cu ajutorul metodei mcGISH am demonstrat că hibridii somatici pierd cromozomi de la ambele specii parentale, dar în mai mare proporție de la *S. bulbocastanum*. Am evidențiat că numărul egal de cromozomi în hibridii diferiți, nu înseamnă și compoziție similară. Identificarea secvenței recombinante, demonstrează prezența introgresiei unui fragment cromozomial de la specia sălbatică în genomul cartofului cultivat.

3. Funcționalitatea genelor de rezistență a fost verificată cu ajutorul metodei de agroinfiltrare. Rezultatele obținute demonstrează prezența reacției oxidative bifazice la hibridii rezistenți la mana târzie și importanța apariției acestui răspuns. Modelul sintezei apei oxigenate prezintă

diferențe în funcție de genotip. De asemenea, a fost evidențiată o corelație pozitivă între prezența genei de rezistență *Rpi-blb3* și nivelul crescut de sinteză a apei oxigenate.

4. În ultima parte a cercetării, am demonstrat că stres-selecția *in vitro* este un proces eficient, pentru a selecta hibridii toleranți la stresul hidric. Hibridii somatici plantați în platforma de fenotipare de la Centrul de Cercetări Biologice de la Szeged au toleranță la stresul hidric, fapt demonstrat de parametrii investigați. Biomasa verde a plantelor nu a scăzut semnificativ în condiții de stres hidric, însă a fost înregistrată o scădere substanțială a producției de tuberculi. Conform datelor din literatură, cartoful cultivat este sensibil la stresul hidric, rezultatele noastre au demonstrat că specia *S. bulbocastanum* este tolerant la secetă.

Studiul asupra fotosintezei plantelor arată că, acest proces este stabil la hibridii somatici în condiții de stres hidric moderat. Am evidențiat, de asemenea, că stresul hidric aplicat nu afectează randamentul cuantic potențial al fotosistemului II (PSII), ceea ce reflectă o absență a deteriorării complexelor proteice implicate în fotosinteză. Rezultatele măsurătorii repetate, arată că fixarea carbonului este mai puțin afectată la începutul stresului hidric, decât la sfârșitul acestei perioade. Hibridii somatici au capacitatea de a se adapta la lipsa de apă și de a menține stabilitatea procesului de fotosinteză, rezultate care sunt în acordanță cu rezultatele determinării biomasei.

Pe baze rezultatelor obținute în experimentele noastre, putem afirma prezența caracterelor avantajoase, rezistența la mana târzie și toleranța la stresul hidric, în hibridii somatici analizați. Caracterele speciei sălbatice au fost transferate cu succes în genofondul cartofului cultivat.

În final putem concludiona că hibridii somatici între cartoful cultivat și *Solanum bulbocastanum* reprezintă un material valoros, unic iar prin cercetările originale prezentate în această teză am reușit să aducem date noi referitoare la:

- gradul de ploidie și compoziția lor genomică;
- evidențierea histochimică a moleculelor reactive de oxigen după agroinfiltrarea plantei cu efectorii specifici, în funcție de prezența genelor de rezistență *Rpi-blb1* și/sau *Rpi-blb3*;
- selecția unor hibridii toleranți la stresul hidric, prin utilizarea unei platforme de fenotipare HAS RDS Szeged, Ungaria în cadrul rețelei europene de fenotipare EPPN [1].

VI. Bibliografie selectată

- Able A.J. (2003): Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens; *Protoplasma*, **221**(1):137-143.
- Ashraf M., Harris P.J.C. (2013): Photosynthesis under stressful environments: An overview; *Photosynthetica*, **51**(2):163-190.
- Asselbergh B., Curvers K., Francxa S.C., Audenaert K., Vuylsteke M., Breusegem F.V., Höfte M. (2007): Resistance to *Botrytis cinerea in sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis; *Plant Physiol*, **144**:1863–1877.
- Baciu, A., Petruș –Vancea A., Nemes Z., Motica R., Mike L. (2009): Results regarding new Romanian *Phytophthora infestans* potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars reaction to *in vitro* culture conditions; *Analele Universității din Oradea*, XVI/2:11-14.
- Basu P.S., Sharma, A., Garg I.D., Sukumaran N.P. (1999): Tuber sink modifies photosynthetic response in potato under water stress; *Environ Exp Bot*, **42**:25-39.
- Benavente E., Cifuentes M., Dusautoir J.C., David J. (2008): The use of cytogenetic tools for studies in the crop-to-wild gene transfer scenario; *Cytogenet Genome Res*, **120**(3-4):384-95.
- Bradshaw J.E., Ryan G.J., Ramsay G. (2006): Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding; *Potato Res*, **49**: 49–65.
- Brammer S.P., Vasconcelos S., Poersch L.B., Oliveira A.R., Brasileiro-Vidal A.C. (2013): Genomic *in situ* hybridization in *Triticeae*: A methodological approach; *Plant breeding from laboratories to fields*; (Ed: Prof. Sven Bode Andersen; ISBN: 978-953-51-1090-3, InTech, DOI: 10.5772/52928DOI: 10.5772/52928.
- Brestic M., Zivcak M. (2015): PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications; In: *Molecular stress physiology of plants*; (Ed: Rout G.R., Das A.B.), Dordrecht, DOI 10.1007/978-81-322-0807-5, 87-133.
- Butterfass T. (1973): Control of plastid division by means of nuclear DNA amount; *Protoplasma*, **76**:167—195.
- Chaudhary B. (2013): Plant domestication and resistance to herbivory; *Int. J. of Plant Genomics* doi.org/10.1155/2013/572784.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. (2006): Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response; *Cell*, **124**:803–814.
- Coleman W.K. (2008): Evaluation of wild *Solanum* species for drought resistance: 1. *Solanum gandarillasii* Cardenas; *Environ Exp Bot*, **62**:221–230.
- Costa L.D., Vedove G.D., Gianquinto G., Giovanardi R., Peressotti A. (1997): Yield, water use efficiency and nitrogen uptake in potato: influence of drought stress; *Potato Res*, **40**(1): 19-34.

- Demming-Adams B., Adams W.W., Barker D.H., Logan B.A., Bowling D.R., Verhoeven A.S. Demming-Adams B., Adams W.W., Barker D.H., Logan B.A., Bowling D.R., Verhoeven A.S. (1996): Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation; *Physiol. Plant.*, **98**:253-264.
- Dénes T.É., Molnár I., Rákósy-Tican E. (2015): New insights in the interaction between cultivated potato and *Phytophthora infestans*; *Studia Biologica*, LX, 1:165-175.
- Devi J., Ko J.M., Seo M.M. (2005): FISH and GISH: Modern cytogenetic techniques; *Indian J Biotech*, **4**:307-315.
- Doležel J., Johann Greilhuber J., Suda J. (2007): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry; *Nat Protoc*, **2**(9):2233-2244.
- Du J., Rietman, H., Vleeshouwers V.G.A.A. (2014): Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana*; *J Vis Exp*, 83, e50971, 1-7.
- Fehér-Juhász E., Majer P., Sass L., Lantos Cs., Csisár J., Turóczy Z., Mihály R., Mai A., Horváth V.G., Vass I., Pauk J. (2014): Phenotyping shows improved physiological traits and seed yield of transgenic wheat plants expressing the alfalfa aldose reductase under permanent drought stress; *Acta Physiol Plant*, **36**:663–673.
- Fiorani F., Schnurr U. (2013): Future scenarios for plant phenotyping; *Annu Rev Plant Biol*, **64**:17.1-17.25.
- Fleisher D.H., Datheb A., Timlina D.J., Reddy V.R. (2015): Improving potato drought simulations: Assessing water stress factors using a coupled model; *Agric For Meteorol*, **200**:144–155.
- Flagella Z., Campanile R.G., Stoppelli M.C., Caro A.D., Fonzo N.D. (1998): Drought tolerance of photosynthetic electron transport under CO₂-enriched and normal air in cereal species; *Physiol Plantarum*, **104**:753-759.
- Fodorpataki L. (2004): A növényekfotoszintézise; *Kritterion*, Cluj Napoca.
- Fry W. (2008): *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer; *Molecular Plant Pathology*, **9**(3):1-17.
- Gavrilenko T., Larkka J., Pehu E., Rokka V.-M. (2002): Identification of mitotic chromosomes Gavrilenko T., Larkka J., Pehu E., Rokka V.-M. (2002): Identification of mitotic chromosomes of tuberous and non-tuberous *Solanum* species (*Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens*) by GISH in their interspecific hybrids; *Genome*, **45**:442-449.
- Gavrilenko T., Thieme R., Heimbach U., Thieme T. (2003): Fertile somatic hybrids of *Solanum etuberosum* (+) dihaploid *Solanum tuberosum* and their backcrossing progenies: relationship of genome dosage with tuber development and resistance to potato virus Y; *Euphytica*, **131**:323-332.
- Gavrilenko, T. (2007): Potato cytogenetics; In: *Potato biology and biotechnology: Advances and perspectives*, (Ed: Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gerbhardt Gover F., C., MacKerron, Taylor M., Ross H.), Elsevier Science, Italy, 203 – 216.
- Glimelius K., Fahleson J., Landgren M., Sjödin C., Sundberg E. (1991): Gene transfer via somatic hybridization in plants; *Trends Biotechnol*, **9**(1):24-30.
- Gopal J., Iwama K. (2007): *In vitro* screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol; *Plant Cell Rep*, **26**:693–700.

- Granier C., Vile D.: Phenotyping and beyond: modelling the relationships between traits; *Curr Opin Plant Biol*, **18**:96–102.
- Grosser J.W., Ollitrault P., Olivares-Fuster O. (2000): Somatic hybridization in *Citrus* an effective tool to facilitate variety improvement; *In vitro Cell Dev Bio-Plant*, **36**: 434-449.
- Gyetzvai G, Sønderkær M., Göbel U., Basekow R., Ballvora A., Imhoff M., Kersten B., Nielsen K-L., Gebhardt C. (2012):The transcriptome of compatible and incompatible interactions of potato (*Solanum tuberosum*) with *Phytophthora infestans* revealed by DeepSAGE analysis; *Plos One*, **7**(2):e31526.
- Han Q., Thieme R., Gao X., Kang Z., Huan L. (2013): Investigation of host responses of different potato genotype at tissue, cellular and subcellular levels after infection with *Phytophthora infestans*, *Am J Potato Res*, **90**:525-532.
- Harms C.T. (1983): Somatic incompatibility in the development of higher plant somatic hybrids; *Q Rev Biol*, **58**:325–353.
- Iovene M., Savarese S., Cardi T., Frusciante L., Scotti, N., Simon P.W., Carputoa D. (2007): Nuclear and cytoplasmic genome composition of *Solanum bulbocastanum* (+) *S. tuberosum* somatic hybrids; *Genome*, **50**:443-450.
- Jang T-S., Weiss-Schneeweiss H. (2015): Formamide-free genomic in situ hybridization allows unambiguous discrimination of highly similar parental genomes in diploid hybrids and allopolyploids; *Cytogen Genome Res*, DOI: 10.1159/000441210.
- Jefferies R.A. (1994): Drought and chlorophyll fluorescence in field-grown potato (*Solanum tuberosum*); *Physiol Plantarum*, **90**(1): 93-97.
- Jo K.R., Arens M., Kim T-Y, Jongsma M.A., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. (2011): Mapping of the *S. demissum* late blight resistance gene *R8* to a new locus on chromosome IX; *Theor Appl Genet*, **123**:1331–1340.
- Kamoun, S. (2006): A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Rev Phytopathol.*, **44**:41-60.
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka (2007): Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH Oxidase; *Plant Cell*, **19**:1065-1080.
- Kostoff D. (1938): Studies on polyploid plants. XVIII. Cytogenetic studies on *Nicotiana sylvestris* × *N. tomentosiformis* hybrids and amphidiploids and their bearings on the problem of the origin of *N. tabacum*; *Crit Rev Acad Sci*, **18**:459-462.
- Kruppa K., Türkösi E., Szakács É., Cseh A., Molnár-Láng M. (2013): Development and Identification of a 4HL.5DL Wheat/Barley Centric Fusion Using GISH, FISH and SSR Markers; *Cereal Res Commun*, **41**:221-229.
- Kuźniak E., Świercza U., Chojak J., Sekulska-Nalewajko J., Gocłowski J. (2013): Automated image analysis for quantification of histochemical detection of reactive oxygen species and necrotic infection symptoms in plant leaves; *J Plant Interact*, **9**(1):167-174.
- Li J., Cang Z., Jiao F., Bai X., Zhang D., Zhai R. (2015): Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage; *Saudi Soc. Agricul Sci*, dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2015.03.001.

- Masuelli R.W., Camadro E.L. (1997): Crossability relationships among wild potato species with different ploidies and Endosperm Balance Numbers (EBN); *Euphytica*, **94**:227-235.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000): Chlorophyll fluorescence-a practical guide; *J Exp Bot*, **51**(345):659-668.
- Menke U., Schilde-Rentschler L., Ruoss B., Zanke C., Hemleben V., Ninnemann H. (1996): Somatic hybrids between the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. and the 1EBN wild species *Solanum pinnatisectum* Dun.: morphological and molecular characterization; *Theor Appl Genet*, **92**:617-626.
- Obidiegwu J., Bryan G.J., Jones H.G., Prashar A. (2015): Coping with drought stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement; *Front Plan Sci*, **6**:542.
- Orczyk O., Przetakiewicz J., Nadolska-Orczyk A. (2003): Somatic hybrids of *Solanum tuberosum*-application to genetics and breeding; *Plant Cell Tiss Org*, **74**:1-13.
- Pendinen G., Spooner D.M., Jiang J., Gavrilenko T. (2012): Genomic *in situ* hybridization reveals both auto- and allopolyploid origins of different North and Central American hexaploid potato (*Solanum* sect. *Petota*) species; *Genome*, **55**:407-415.
- Pijnacker L. P., Ferwerda M.A., Puite K. J., Roest S. (1987): Elimination of *Solanum phureja* nucleolar chromosomes in *S. tuberosum* + *S. phureja* somatic hybrids; *Theor Appl Genet*, **73**:878- 882.
- Polkowska-Kowalczyk L., Wielgat B., Maciejewska U. (2004): The elicitor-induced oxidative processes in leaves of *Solanum* species with differential polygenic resistance to *Phytophthora infestans*; *J Plant Physiol*, **161**:913-920.
- Rákósy-Tican E. (2005): Ingineria genetică vegetală; Casa Cărții de Știință, Cluj Napoca, 149-165.
- Rákósy-Tican E., Thieme R., Nachtigall M., Molnár I., Dénes T.E. (2015): The recipient potato cultivar influences the genetic makeup of the somatic hybrids between five potato cultivars and one cloned accession of sexually incompatible species *Solanum bulbocastanum* Dun.; *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **122**:395-407.
- Rákósy-Ticant E., Aurori a., Thieme R., Grumeza R., Fabelaer I., Riek J., Angenon G. (2005): Cytogenetic and molecular characterization of somatic hybrids between *Solanum* cultivars and *Solanum bulbocastanum*; *Romanian J Genet*, **1**(2):68-67.
- Rouxel T., Balesdent M.H. (2012): Avirulence genes, *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-15.
- Sprenger H., Rudack K., Schudoma C., Neumann A., Seddig S., Peters R., Zuther E., Kopka J., Hinch D.K., Walther D., Köhl K. (2015): Assessment of drought tolerance and its potential; *Func Plant Biol*, **42**:655-667.
- Stupar R.M., Song J., Tek A.L., Cheng Z., Dong F., Jiang J. (2002): Highly condensed potato pericentromeric heterochromatin contains rDNA –related tandem repeats; *Genetics* **162**: 1435-1444.
- Sundberg E., Glimelius K. (1991): Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae*; *Theor Appl Genet*, **83**:81-88.

- Termorshuizen, A.J. (2007) Fungal and fungus-like pathogens of potato; In: Potato biotechnology advance and perspectives; (Ed: Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gerbhardt Gover F., C., MacKerron, Taylor M., Ross H.), Elsevier Science, Italy, 643-686.
- Torres M.A. (2010): ROS in biotic interactions; *Physiol Plantarum*, **138**:414-429.
- Torres M.A., Jones J.D.G., Dangl J.L. (2006): Reactive oxygen species signalling in response to pathogen; *Plant Physiol.*, **141**:373-378.
- Turkensteen L.J., Fliera W.G., Wanningena R., Mulder A. (2000): Production, survival and infectivity of oospores of *Phytophthora infestans*; *Plant Pathol*, **49**:688-696.
- Vlad G.H., Done C.M. (2014) Potato crop evolution in Romania; *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, **14**(1): 1-4.
- Vleeshouwers, G.A.A. V., Raffaello, S., Voosen, J., Champouret, Oliva, R., Segretin, E.M., Rietman, H., Cano, M. L., Lokossou, A, Kessel, G., Pel, A.M., Kamoun, S. (2011): Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors; *Annu Rev Phytopathol*, **49**:25.1-25.25.
- Waara S., Glimelius K. (1995): The potential of somatic hybridization in crop breeding; *Euphytica*, **85**:217-233.
- Wegener C.B., Jansen G., Jürgens H-U. (2015): Bioactive compounds in potatoes: Accumulation under drought stress conditions; *Funct Food Health Di.*, **5**(3):108-116.
- Wi S.J., Ji N.R., Park K.Y. (2012): Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic *Phytophthora parasitica* in tobacco plants; *Plant Physiol*, **159**: 251–265.
- Wojtaszek P. (1997): Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection; *Biochem J*, **322**:681-692.
- [1]- <http://www.plant-phenotyping-network.eu/>
- [2]- http://www.biosafety.be/PDF/2001_18.pdf- directive 2001/18/EC – annex 1B