

**UNIVERSITATEA DE STIINTE AGRONOMICE SI  
MEDICINĂ VETERINARĂ  
FACULTATEA DE HORTICULTURĂ  
BUCURESTI**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**CONTRIBUTII PRIVIND OPTIMIZAREA PROCESULUI  
TEHNOLOGIC DE AMELIORARE A UNOR GENOTIPURI  
DE VITĂ DE VIE DIN PUNCT DE VEDERE AL  
CARACTERULUI DE REZISTENȚĂ LA PRINCIPALELE  
BOLI CRIPTOGAMICE PRIN UTILIZAREA TEHNICILOR  
NUCLEARE**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC**

**Prof. Univ. Dr. STOIAN VIOREL**

**DOCTORAND**

**Biolog BRÎNDUSE ELENA**

**2006**

## INTRODUCERE

### *Cap. 1 STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR EFECTUATE IN DOMENIUL ABORDAT PRIN TEZA DE DOCTORAT*

- 1.1 Necesitatea utilizării tehnicilor nucleare în procesul de ameliorare calitativă a vitei de vie
- 1.2 Scurt istoric privind ameliorarea plantelor prin mutageneză indusă
- 1.3 Mecanismul inducerii mutațiilor la vite de vie
- 1.4 Manipularea materialului biologic după tratament
- 1.5 Stadiul actual al cercetărilor privind ameliorarea vitei de vie prin mutageneză somatică spontană
- 1.6 Stadiul actual al cercetărilor privind ameliorarea vitei de vie prin mutageneză indusă

#### Concluzii parțiale

### *Cap. 2 CERCETĂRI PRIVIND INTEGRAREA BIOTEHNOLOGIILOR IN PROCESUL DE AMELIORARE GENETICĂ A VITEI DE VIE PRIN TEHNICI NUCLEARE*

Includerea biotehnologiilor în programele de ameliorare viticolă

- 2.1 Scurt istoric privind cultura tesuturilor vegetale in vitro
- 2.2 Importanța utilizării tehnicilor nucleare în condiții de cultură in vitro
- 2.3 Principalele etape ale procesului de ameliorare prin mutageneză in vitro
- 2.4 Integrarea tehnicilor de cultură in vitro în procesul de ameliorare viticolă prin mutageneză
- 2.5 Rezultate privind aplicarea tehnicilor nucleare în condiții de cultură in vitro la vite de vie

#### Concluzii parțiale

Cap. 3 *REZULTATE OBTINUTE SI INTERPRETAREA LOR*

3.1 AMELIORAREA GENOTIPURILOR VINIFERA DIN PUNCT DE VEDERE AL GRADULUI DE REZISTENȚĂ LA MANĂ PRIN UTILIZAREA TEHNICILOR DE CULTURĂ IN VITRO

3.1.1 Materialul biologic si metoda de cercetare

3.1.1a Asigurarea materialului biologic ce va fi supus tratamentelor mutagene

3.1.1b Realizarea tratamentelor radiomutagene si izolarea mutatiilor somatice

3.1.1c Analiza mutantelor selectionate în conditii de câmp

3.1.2 Rezultate obtinute,

3.1.2a Asigurarea materialului biologic ce va fi supus tratamentelor mutagene

- Cultura tesuturilor meristemice apicale
- Cultura explantelor nodale
- Cultura explantelor foliare

3.1.2b Realizarea tratamentelor radiomutagene si izolarea mutatiilor somatice

- Influenta tratamentului radiomutagen asupra evolutiei explantelor
- Acomodarea treptată a plantelor tinând cont de originea explantelor iradiate

3.1.2c Analiza fenotipică si biochimică a mutantelor obtinute după plantarea în condiții de câmp

- Analiza foliară
- Pornirea în vegetatie si determinarea fertilității reale în funcție de sistemul de tăiere
- Indicii de productivitate relativ si absolut în funcție de sistemul de tăiere
- Influenta tratamentului radiomutagen asupra calității si cantității productiei de struguri
- Evolutia continutului în auxină endogenă în cursul perioadei de vegetatie
- Evolutia activității catalazei si peroxidazei la plantele mutante comparativ cu martorul neiradiat în funcție de sistemul de tăiere

- Evolutia continutului de pigmenti asimilatori în funcție de sistemul de tăiere
- Evolutia activității fotosintetice în funcție de originea plantelor, fenofazele vegetative și în funcție de sistemul de tăiere
- Evolutia continutului în glucide, amidon și proteine în funcție de sistemul de tăiere
- Continutul în aminoacizi liberi la mutante comparativ cu martorul neiradiat

#### 3.1.2d Analiza microscopică a mutantelor obținute după plantarea în condiții de câmp

- Variația dimensiunii și frecvenței stomatelor pe unitatea de suprafață
- Caracterizarea polenului din punct de vedere al numărului de pori germinativi și al variabilității diametrului longitudinal
- Analiza cariotipului
- Analiza ultrastructurală

#### Concluzii parțiale

### 3.2 AMELIORAREA GENOTIPURILOR VINIFERA DIN PUNCT DE VEDERE AL CARACTERULUI DE REZISTENTĂ LA MANĂ PRIN EFECTUAREA DE HIBRIDĂRI INTERSPECIFICE CU POLEN IRADIAT

#### 3.2.1 Materialul biologic și metoda de lucru

#### 3.2.2 Rezultate obținute

##### 3.2.2a Observații efectuate in vitro

- Germinarea embrionilor in vitro în funcție de doza de iradiere și perioada de inoculare
- Diferențierea plantelor prin embriocultură in vitro
- Diferențierea plantelor din embrionii în ovulo germinati
- Prelucrarea statistică a datelor (testul ANOVA) privind influența dozei de iradiere asupra diferențierii plantelor
- Germinarea embrionilor în ovulo după formarea calusului

- Germinarea directă a embrionilor in ovulo
- Modificări morfologice induse de tratamentul mutagen la nivel de cotiledon
- Diferențierea de ovule poliembriionice

#### 3.2.2b Observatii efectuate in vivo

- Rezultate privind germinarea embrionilor in vivo
- Dinamica germinatiei semintelor
- Efectul dozei de iradiere asupra răsării plantelor
- Prelucrarea statistică a datelor privind influenta dozei de iradiere asupra răsării plantelor
- Dinamica răsăritului
- Modificări fenotipice induse de tratament la nivelul cotiledoanelor
- Modificări fenotipice induse de tratament la nivelul plantei adulte

#### 3.2.2c Comparatie privind evolutia embrionilor in vitro si in vivo

Concluzii partiale

### 3.3 STUDII PRIVIND SELECTIA UNOR GENOTIPURI VINIFERA OBTINUTE PRIN TEHNICI NUCLEARE DIN PUNCT DE VEDERE AL CAPACITĂȚII DE REZISTENTĂ LA MANĂ

#### 3.3.1 Materialul biologic si metoda de cercetare

- Testul « dublei – culturi »
- Testul discurilor foliare

#### 3.3.2 Rezultate si discutii

- Evaluarea rezistentei la mană, comparativ, în conditii in vitro, seră si câmp la genotipurile luate în studiu

Concluzii partiale

Concluzii generale

**CONTRIBUTII PRIVIND OPTIMIZAREA PROCESULUI  
TEHNOLOGIC DE AMELIORARE A UNOR GENOTIPURI DE VITĂ  
DE VIE DIN PUNCT DE VEDERE AL CARACTERULUI DE  
REZISTENTĂ LA PRINCIPALELE BOLI CRIPTOGAMICE PRIN  
UTILIZAREA TEHNICILOR NUCLEARE**

**INTRODUCERE**

În 1865, Gregor Mendel a demonstrat că elementele eredității denumite “gene” sunt transmise intact de la o generație la alta. Radiatiile ionizante, descoperite de Röntgen în 1895 au fost identificate curând ca mijloace suficient de puternice pentru a interfera cu bazele moleculare, înalt protejate, ale eredității. Substanțele chimice mutagene au fost descoperite 50 de ani mai târziu.

Au fost necesari însă cel puțin 25 de ani de experimentări pentru a se evidenția rolul radiatiilor ionizante în procesul de inducere a mutațiilor prin modificarea genelor și pentru a se verifica în practică ipoteza privind inducerea modificărilor ereditare la plante.

Cercetările privind inducerea mutațiilor la plante au adus, până în anul 1950 o mică contribuție în ameliorarea plantelor, deși, începând cu anul 1940 au fost stabilite metode practice de ameliorare a plantelor prin mutageneză indusă.

Rezistența plantelor de cultură la agenții patogeni a reprezentat un prim obiectiv al experiențelor de mutageneză indusă și primul soi rezistent la făinare a fost obținut în 1942.

Majoritatea soiurilor obținute prin tehnici nucleare și introduse în practică până în anul 1970 au fost, mai mult produsul unor cercetări de natură fundamentală.

Tehnicile nucleare au început să fie mai avantajoase din punct de vedere economic, după 1970 când diferite metodologii de tratament au fost aplicate pe o gamă largă de plante.

Numărul de soiuri create prin mutageneză sau prin utilizarea mutantelor în hibridare a crescut rapid. 2024 de genotipuri mutante, la 150 de specii horticole și agricole, testate, aprobate și recomandate de autoritățile naționale, au fost comercializate până în anul 2003.

Au fost realizate sute de soiuri ameliorate, cu rezistență sporită la boli, dăunători și factori de mediu nefavorabili, ceea ce demonstrează valoarea economică a acestei tehnologii.

Cel puțin 200 de soiuri realizate prin mutageneză se remarcă prin producții foarte mari, evidențiind rolul important al tehnicilor nucleare în ameliorarea caracterelor cu determinism poligenic.

Calitățile deosebite ale multor soiuri create prin mutageneză au convins pe amelioratori că mutațiile induse reprezintă o sursă valoroasă de germoplasmă pentru ameliorarea conventională. Mutageneza indusă poate fi privită deci ca o metodă complementară metodelor conventionale de ameliorare, putând fi evaluată în comparație cu alte surse de creare a variației genetice, în special cu recombinația genelor prin hibridare.

În comparație cu hibridarea, tehnicile nucleare oferă principalul avantaj de a modifica numai unul sau foarte puține caractere ale unui soi și de a obține mult mai repede un soi ameliorat.

Tratamentele mutagene afectează întregul genom, incluzând DNA-ul nuclear și citoplasmatic. Numărul genelor nucleare pot fi de ordinul a 100.000. Astfel, la o rată de inducere a mutației de  $10^{-4}$  per locus, pot fi obținute  $\pm 10$  mutații nucleare în fiecare celulă.

## Introducere

Cu toate acestea, s-a evidențiat faptul că în majoritatea cazurilor o mutantă afectează o singură genă "lăsând restul genotipului neschimbat".

Aplicarea agenților mutageni pe plante heterozigote (în special hibridi  $F_1$ ) permite ca, nu numai două ci chiar mai multe alele diferite, ca la homozigoti să fie expuse tratamentului mutagen și determină o intensificare a procesului de recombinare genetică.

Au fost întreprinse studii pentru a aprecia valoarea economică a acestor soiuri care au evidențiat faptul că ea depășește de multe ori investiția în cercetările de mutageneză. O astfel de estimare a costului ameliorării prin mutageneză indusă a fost efectuată în Italia. Un soi de grâu ameliorat prin tehnici nucleare a adus un beneficiu de  $7 \times 10^6$  US \$ pe an, în timp ce costul total al cercetărilor de radiobiologie, mutageneză, citologie, citogenetică și ameliorare, timp de 15 ani, la Centrul de Cercetări Nucleare, Cassacia, Roma a fost de  $3,5 \times 10^6$  US \$.

Mutageneza indusă a fost și rămâne încă foarte importantă în cercetările de genetică fundamentală. Mutatiile au devenit metoda analitică standard de descoperire a genelor, de analiză genomică și de elucidare a proceselor biochimice. Gene mutante marker sunt utilizate în ingineria genetică. Biotehnologiile moderne și genetica moleculară utilizate în scopul ameliorării plantelor nu pot evolua fără mutageneza indusă.

Ca urmare a perfecționării rapide a aparaturii de laborator se preconizează ca amelioratorii să acorde o atenție mai mare manipulării individuale a genelor, mutației genice și reconstrucției genomice, nu numai în nucleu dar și în citoplasmă. De aceea, se poate spune, fără exagerare că mutageneza indusă a început să joace un rol important în ameliorarea plantelor.



Deoarece, spre deosebire de alte plante de cultură, cercetările de mutagenză indusă, și în special cele bazate pe utilizarea biotehnologiilor sunt foarte limitate la vita de vie am considerat necesară abordarea acestui studiu.