

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII**  
**UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA**

**Cu titlu de manuscris:**

**C.Z.U: 575:578.76:631.526**

**ANDRONIC Larisa**

**CITOGENETICA PROCESULUI DE PATOGENEZĂ**  
**VIRALĂ LA PLANTELE DE CULTURĂ**

**SPECIALITATEA 162.01-GENETICĂ VEGETALĂ**

Rezumatul tezei de doctor habilitat în științe biologice

**CHIȘINĂU, 2020**

Teza a fost elaborată în Laboratorul Biotehnologiei vegetale din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor

**Consultant științific:**

DUCA Maria, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician

**Referenți oficiali:**

GRATI Vasile, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar

VOLOȘCIUC Leonid, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

CALALB Tatiana, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar universitar

**Componenta Consiliului științific specializat:**

PALII Andrei, **președinte**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, m.c. al AȘM

PORT Angela, **secretar științific**, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

LUPASCU Galina, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

ROTARI Alexandru, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

SPÎNU Constantin, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar

Susținerea va avea loc la 27 ianuarie 2021, ora 10:00 în ședința Consiliului științific specializat DH 162.01-06 *Genetică vegetală* din cadrul Universității de Stat din Moldova, str. Academiei 3/2.

Teza de doctor habilitat și rezumatul pot fi consultate la biblioteca Universității de Stat din Moldova (str. Alexe Mateevici 60) și pe pagina web a ANACEC ([www.cnaa.md](http://www.cnaa.md)).

Rezumatul a fost expedit la 22 decembrie 2020.

**Secretar științific al Consiliului științific specializat**

PORT Angela, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

**Consultant științific**

DUCA Maria, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician

**Autor**

ANDRONIC Larisa, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

## CUPRINS

|                                                                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII.....</b>                                                                                                             | <b>4</b>  |
| <b>INTRODUCERE .....</b>                                                                                                                                    | <b>9</b>  |
| <b>1. CITOGENETICA PATOGENEZEI VIRALE (reviul literaturii).....</b>                                                                                         | <b>9</b>  |
| <b>2. MATERIALELE ȘI METODELE DE CERCETARE.....</b>                                                                                                         | <b>9</b>  |
| <b>3. EXPRESII CITOPATOLOGICE ALE VIROZELOR LA PLANTELE DE CULTURA.....</b>                                                                                 | <b>11</b> |
| 3.1. Reacții citopatice induse de viroze la tomate.....                                                                                                     | 11        |
| 3.2. Aspecte ultrastructurale ale celulelor mezofilului la orz în cazul infectării cu virusul mozaicului dungat al orzului .....                            | 13        |
| 3.3. Citopatologia celulelor mezofilului la plantele de varză infectate cu virusul mozaicului conopidei .....                                               | 14        |
| <b>4. MICROSPOROGENEZA LA TOMATE ȘI ORZ ÎN CONDIȚII DE PATOGENEZĂ VIRALĂ .....</b>                                                                          | <b>15</b> |
| 4.1. Studiul procesului de meioză la tomate în condiții de patogeneză virală .....                                                                          | 15        |
| 4.2. Studiul procesului de meioză la orzul de primăvară în condiții de patogeneză virală.....                                                               | 18        |
| 4.3. Evaluarea citogenetică a microsporogenezei la plantele de tomate și orz în condiții de patogeneză virală.....                                          | 19        |
| 4.4. Regularitatea diviziunilor meiotice la tomate și orz în condiții de patogeneză virală.....                                                             | 23        |
| <b>5. EVALUĂRI CITOGENETICE ALE PATOGENEZEI VIRALE LA PLANTELE INFECTATE ȘI LA DESCENDENȚII ACESTORA.....</b>                                               | <b>25</b> |
| 5.1. Reacții defensive specifice și nespecifice ale tomatelor infectate cu virusuri și a descendenților acestora .....                                      | 25        |
| 5.2. Efectul mitogen și aneugen indus de virusul dungat al orzului la plantele gazdă.....                                                                   | 28        |
| 5.3. Efectul clastogen cauzat de virusul mozaicului dungat al orzului la plantele gazdă .....                                                               | 29        |
| 5.4. Expresia unor gene asociate stresului la orz și descendenții obținuți de la plante infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului .....             | 31        |
| 5.5. Efectul nucleopatic cauzat de virusul mozaicului conopidei în sisteme citopatice la nivelul structurilor calusale ale diferitelor soiuri de varză..... | 33        |
| <b>6. MANIFESTAREA CARACTERELOR CANTITATIVE ȘI CALITATIVE LA PLANTELE INFECTATE CU VIRUSURI ȘI LA DESCENDENȚII ACESTORA .....</b>                           | <b>35</b> |
| 6.1. Variabilitatea caracterelor cantitative la tomate și descendenții plantelor supuse acțiunii infecției virale .....                                     | 35        |
| 6.2. Variabilitatea caracterelor cantitative la orz și descendenții plantelor supuse acțiunii infecției virale.....                                         | 37        |
| 6.3. Impactul virusului mozaicului conopidei în inducerea variabilității somaclonale la plantele gazdă.....                                                 | 40        |
| <b>CONCLUZII GENERALE .....</b>                                                                                                                             | <b>41</b> |
| <b>RECOMANDĂRI PRACTICE .....</b>                                                                                                                           | <b>42</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ .....</b>                                                                                                                         | <b>43</b> |
| <b>ADNOTARI (română, engleză, rusă) .....</b>                                                                                                               | <b>47</b> |

## REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

**Actualitatea și importanța temei abordate.** Cerințele actuale expuse față de obiectivele de dezvoltare a economiei naționale a Republicii Moldova impun întreprinderea anumitor schimbări esențiale în tehnologiile de ameliorare a plantelor bazate pe abordări, care să permită sporirea considerabilă a recoltelor în baza elaborării procedeeleor și biotehnologiilor pentru asigurarea creării direcționate a soiurilor și formelor de plante cu productivitate și calitate sporită, rezistență la boli și toleranță la factorii climatici nefavorabili. Progresele importante pe care le-a înregistrat în ultimele decenii genetica contribuie la fundamentarea unor noi căi de manipulare a materialului ereditar, astfel ca să răspundă sarcinilor biologiei aplicate. În această direcție se înscriu lucrările consacrate cercetărilor ce au drept scop extinderea variabilității genetice și obținerea formelor cu combinații de gene valoroase. Programele de ameliorare orientate pe crearea de soiuri performante necesită atragerea de noi surse de germoplasmă, obținute prin inducerea unei diversități cât mai mari. Totodată, în realizarea acestor deziderate există mai multe bariere cum ar fi: distribuirea co-orientată a schimburilor cromatidice, limitarea recombinării datorită interferenței alelelor, recesivitatea genelor ce controlează recombinarea [60]. Tradițional în ameliorare, pentru depășirea acestor bariere, drept procedee de obținere și majorare a variabilității, se aplică hibridarea, mutageneza experimentală [37], cultura *in vitro* [9].

Virusurile reprezintă cel mai important grup de patogeni cu impact negativ asupra plantelor de cultură, cauzând reduceri majore ale recoltei cu afectarea semnificativă a calității producției. Conform relatărilor din literatura de specialitate din ultimele decenii, infecțiile virale după impactul provocat asupra sistemelor biologice sunt considerate factori cu acțiune la nivel molecular [33]. În pofida progreselor realizate în cunoașterea bazelor patogenezei virale, există mulți determinanți de patogenitate pentru care indicii cu privire la mecanismul lor de acțiune sunt încă neelucidați. Studiile ce pot contribui la evaluarea situației, impun necesitatea extinderii numărului de patosisteme experimentale și a condițiilor de interacțiune gazdă-patogen, conducând la relevarea mecanismelor alternative de apărare a plantelor.

**Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemelor de cercetare.** Conform unor date recente se cunosc peste 1500 de virusuri capabile să infecteze plantele [41]. Impactul economic negativ provocat de viroze variază între 10-80%, iar uneori poate atinge până la 100%. Pentru unele culturi pagubele pot fi atât de majore, încât este pusă în pericol menținerea soiului, liniei sau chiar a speciei. Infecțiile virale generează la plantele infectate un șir de simptome condiționate de mai multe elemente, principalele dintre care sunt relațiile stabilite între genotipul gazdei și a virusului (susceptibilitate, toleranță, rezistență), factorii de mediu, etc.

Fiind paraziți obligatori, virusurile sunt în deplină dependență plastică și energetică de celulele vii infectate. Interacțiunile dintre plante și agenții patogeni se bazează pe mecanisme genetice și epigenetice [32; 45]. Pătrunderea particulelor virale și infectarea unei gazde sensibile cu un virus compatibil contribuie la activarea semnalelor cum ar fi inducerea ARNsi [24], care se extind sistemic de la locul de infectare spre țesuturile neinfectate, inclusiv țesuturile organelor generative, declanșând diverse reacții de răspuns ce au la bază modificarea unor procese și căi metabolice [69]. Ca urmare a conexiunilor dintre virusuri și componentele celulare se stabilesc modificări

în biosinteza compușilor organici, respirație, fotosinteză, sinteza hormonilor și compușilor de semnalizare [31]. Interacțiunile factorilor patogeni și celulari pot provoca, de asemenea, instabilitatea genomului datorită rearanjamentelor structurale ale ADN-ului [61], paramutații [23], perturbări ale recombinării [51; 56; 67], modificări ale expresiei genelor [47]. Se consideră, că virusurile infectează celulele, care se divid activ și pot dezvolta mecanisme pentru declanșarea diviziunilor celulare [34]. Lukens L. și Zhan S. [57] au concluzionat că factorii ce produc modificări în reproducerea celulară induc variabilitate genetică și, respectiv afectează spectrul următoarelor generații. Pentru înțelegerea mecanismului de interacțiune gazdă-patogen este importantă cunoașterea bazei genetico-moleculare a reacțiilor de răspuns în vederea descrierii genotipurilor de interes în programe de ameliorare [10].

Cercetările cu privire la identificarea și dezvoltarea conceptelor patogenezei virale confirmă complexitatea acestui proces. Totodată studiile care au contribuit la progresul acestor evaluări au fost executate pe un număr limitat de patosisteme, dovedind importanța dezvoltării mecanismelor de acțiune a agenților virali asupra gazdelor de importanță economică.

**Scopul cercetărilor:** elucidarea impactului agenților virali în inducerea variabilității genetice și stabilirea efectelor citogenetice ale patogenezei virale la plantele de cultură în baza identificării particularităților proliferărilor mitotice și meiotice în sisteme compatibile gazdă-patogen.

**Obiectivele studiului:**

- identificarea modificărilor induse de infecțiile virale în sistemele celulare diferențiate și în diviziune activă la plantele de cultură (orz, tomate, varză) infectate cu virusuri ARN sau ADN;
- stabilirea particularităților diviziunilor meiotice și mitotice în diverse sisteme gazdă-patogen;
- evaluarea impactului infecțiilor virale asupra procesului de recombinare meiotică și somatică în dependență de particularitățile sistemului gazdă-patogen;
- determinarea specificului proceselor de diviziune celulară la descendenții obținuți în condiții de patogeneză virală;
- estimarea variabilității genetice la plantele infectate și descendenții acestora;
- aprecierea genotoxicității agenților virali la plantele gazdă;
- identificarea mecanismelor implicate în procesul de generare a variabilității genetice induse de infecțiile virale;
- elaborarea procedeeleor de inducere și apreciere a variabilității genetice, precum și de selectare a genotipurilor recombinante cu caractere utile în baza aplicării infecției virale în calitate de factor recombinogen.

**Metodologia cercetării științifice.** Cercetările au fost organizate pe sisteme gazdă-patogen formate în baza genotipurilor sensibile de culturi agricole și virusuri ARN și ADN componente. În conformitate cu specificul agentului viral, au fost selectate gazde compatibile, care asigură reproducerea și propagarea sistemică a infecției fără capacitatea de transmitere verticală (prin polen sau ovule). În scopul evidențierii particularităților structurale și funcționale generate de agenții virali la plantele infectate și descendenții lor au fost utilizate specii autogame (tomate, orz și varză), care au ma-

nifestat sensibilitate (susceptibilitate sau toleranță) la virusurile ADN sau ARN. Cercetările structurale au fost realizate la nivelul țesuturilor și celulelor compatibile (organe vegetative și reproductive), celulelor incompatibile pentru germenii virali (microspori) la plantele infectate. Impactul infecțiilor virale (ARN și ADN) asupra proceselor proliferative a fost stabilit la nivelul țesuturilor generatoare (celule ale meristemelor radiculare, arhesporale), precum și țesuturi calusale (celule somatice aflate în diviziune activă și diferențiere). În scopul aprecierii efectului genetic al infecțiilor virale au fost realizate studii comparative ale acțiunii razelor gama – factor mutagenic cu mecanism de acțiune asupra sistemelor biologice cunoscut.

Pentru realizarea obiectivelor trasate au fost utilizate metode virusologice de diagnostic și studiu al agenților virali; de inducere a variabilității genetice, precum cultura *in vitro* și mutageneza experimentală; metode citogenetice (evaluarea diviziunilor mitotice și meiotice, recombinării meiotice și somatice), moleculare (RT-PCR cantitativ), biochimice (polimorfismul peroxidazelor, polifenoloxidazelor și esterazelor, proteinelor de rezervă, conținutul substanțelor uscate) și biometrice conform ghidurilor UPOV aprobate pentru fiecare cultură.

**Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute** rezidă în argumentarea conceptului privitor la efectele genetice produse de infecțiile virale la gazdele susceptibile, rezultate ce confirmă posibilitatea utilizării fitovirusurilor în calitate de inductori ai variabilității, care prin modul lor de interacțiune cu planta-gazdă modifică structura internă, reorientează procesele de transcripție și translație din celulă, afectând procesele proliferative și variația caracterelor.

Pentru prima oară a fost demonstrată posibilitatea aplicării virusurilor în variația expresiei genelor, mărirea spectrului de recombinării și extinderea diversității genetice, modificări ce pot fi transmise la descendenții plantelor infectate.

**Problema științifică importantă soluționată** constă în fundamentarea unei noi direcții științifice în cercetările biologice ce vizează **efectele genetice** provocate de virusuri la gazdele sensibile, ce a condus la dezvoltarea conceptului privind impactul **fitovirusurilor în calitate de inductori ai variabilității genetice la plantele de cultură**. În baza studiului citogenetic al patogenezei virale au fost stabilite reorganizări structurale, efecte genetice, exprimate prin abateri ale recombinării somatice, meiotice, perturbări ale proceselor proliferative, modificări ale gradului de expresie a genelor asociate patogenezei la gazde și descendenții plantelor infectate, rezultate ce au permis evidențierea marcherilor proteici asociați cu patogeneza virală ce oferă date noi despre particularitățile mecanismelor de susceptibilitate și rezistență ale plantelor la agenții virali.

**Rezultate principale noi pentru știință și practică obținute.** Virozele cauzate de VAT, VXC, VMT, VMDO și VMCo condiționează **modificări macro- și microstructurale**, rezultate în urma interacțiunii dintre patogen și gazda susceptibilă, care se manifestă prin reacții specifice și nespecifice la nivelul țesuturilor ce constituie sediu pentru reproducere și multiplicare a virionilor, precum țesuturile asimilatoare ale frunzelor, țesuturile sterile ale organelor reproductive, dar și a celulelor microsporale lipsite de particule virale. Modificările citopatice induse la nivelul organitelor celulare poartă caracter stereotipic, manifestând **eterogenitate** în gradul de expresie la nivelul unei celule, precum și între celulele aceluiași țesut.

Analiza citologică a microsporogenezei a evidențiat majorarea frecvenței **aberațiilor meiotice** la soiurile de tomate și orz în cazul infectării cu VAT, VXC, și VMDO, respectiv. La plantele infectate s-a constatat o creștere semnificativă a numărului de aberații cromozomale de tipul eliminărilor de cromozomi, cromozomi retardați, punți cu sau fără fragmente; distribuția neuniformă a materialului genetic între celulele fiice; sporirea frecvenței de sporade anormale. Amplitudinea repercusiunilor provocate de agenții virali în procesul de meioză depinde de sistemul virus-plantă, fiind influențată de genotipul gazdei în proporție de cca 50%, iar puterea de acțiune a infecției variază între 18÷36%. Sistemele gazdă-patogen reacționează specific în ceea ce privește cota aberațiilor și spectrul aberațiilor cromozomale.

A fost demonstrată influența infecțiilor virale asupra inducerii mutațiilor meiotice, modificări ale **recombinării mitotice și meiotice**. Urmare a infectării tomatelor cu VAT sau VXC, soiurilor de orz de primăvară – VMDO, are loc sporirea numărului de chiasme interstițiale complementată de majorarea sau micșorarea celor terminale, ceea ce poate rezulta atât din redistribuirea, cât și inducerea unor noi schimburi de segmente cromatidice, reconformări ce pot contribui la sporirea recombinării genelor localizate în același grup de *linkage* și generarea de noi combinații alelice. Impactul infecției virale asupra recombinării meiotice (stabilit în baza evaluării frecvenței și spectrului *crossing-over*-ului meiotic) și mitotice (estimat prin analiza schimburilor între cromatidele surori) denotă **însușirea genotoxică** a VAT, VXC, VMDO. Infecția produsă de VMDO a cauzat anomalii ale fusului de diviziune, precum C-mitozele, ceea ce denotă **caracterul aneugen** și demonstrează **efectul mitodepresiv** al infecției virale.

**Semnificația teoretică.** A fost elucidat răspunsul plantelor la infecțiile virale exprimat la nivel ultrastructural prin reorganizări cu caracter specific, care pot servi drept criteriu pentru detectarea patogenului, și nespecific, manifestat în baza principiilor structurărilor tipice, ce reflectă patogenitatea agentului viral. A fost demonstrat impactul infecțiilor virale asupra celulelor plantei gazdă și aparatului genetic prin inducerea de mutații meiotice, modificări ale recombinării mitotice și meiotice la plantele infectate cu repercusiuni la descendenții obținuți în condiții de patogeneză virală. Infecțiile virale produse la gazdele sensibile generează o gamă largă de reacții de răspunsuri care accentuează asincronismul diviziunilor celulare și eterogenitatea modificărilor morfo-funcționale și genetice. Prin tehnici moleculare (RT-PCR) s-au stabilit abateri specifice ale expresiei genelor implicate în metabolismul antioxidant (APX și SOD), proteinelor asociate patogenezei (PR), dependente de specificitatea fitopatosistemelor, care pot fi utilizate în identificarea genotipurilor cu diferită sensibilitate la agentul viral.

**Valoarea aplicativă a lucrării.** Investigațiile citogenetice ale interacțiunii virusurilor cu plantele gazdă (tomate, orz, varză) au contribuit la identificarea mecanismelor de sporire a variabilității genetice la plantele de cultură, fiind dovedită posibilitatea utilizării fitovirusurilor în calitate de inductori ai variabilității genetice [1; 3; 6]. Urmare a studiilor comparative (razele gama, cultura *in vitro*) ale diversității genetice induse de fitovirusuri s-a stabilit generarea unui polimorfism a mai multor caractere [7; 11; 14]. În baza acestor rezultate a fost demonstrată posibilitatea majorării variabilității genetice în dependență de particularitățile sistemului gazdă-patogen. În cadrul studiului au fost elaborate procedee de extindere a diversității genetice prin utilizarea solitară

a infecțiilor virale sau în asociere cu razele gama / cultura *in vitro* la diferite plante de cultură (tomate, orz, varză) și elucidate particularitățile proliferării celulare, inducerii recombinării somatice sau meiotice [4; 5; 17; 21; 28].

### **Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:**

1. Sistemele gazdă-patogen formate din genotipuri sensibile ale plantelor de cultură și virusuri ARN sau ADN se caracterizează prin modificări macro- și microstructurale ale celulelor infectate (țesuturi asimilatoare, de protecție), dar și a celor lipsite de germenii virali (țesuturi arhesporale), exprimând reacții specifice și stereotipice.

2. La nivelul țesuturilor compatibile procesului infecțios (organe vegetative și reproductive) și incompatibile pentru germenii virali (microspori) se identifică sensibilitate celulară diferențiată.

3. Impactul infecțiilor virale în conjugarea cromozomilor, distribuirea materialului genetic între celulele fiice este comparabil cu efectele produse de razele gama.

4. Efecte destabilizatoare ale microsporogenezei la genotipurile de tomate și orz infectate cu virusuri ce condiționează sporirea asincronismului și accelerarea promovării etapelor meiozei.

5. Sporirea coeziunilor sinaptice și redistribuirea schimburilor cromatidice, la descendenții plantelor infectate sistemic, ce servesc drept sursă de generare a variabilității genetice.

6. Efecte genotoxice, mitogene ale virusurilor ARN la gazde și descendenții plantelor infectate ce includ modificări ale recombinării somatice; perturbarea diviziunilor mitotice, modificări ale expresiei genelor implicate în metabolismul antioxidant (APX și SOD) și proteinelor asociate patogenezei (PR-3, PR-5 și PR-10).

7. Efect nucleopatic de poziție exprimat prin reconformări ale cromatinei pentru virusul ADN component la gazdele sensibile.

8. Procedee de inducere a variabilității genetice cu aplicare a infecției virale ca factor recombinogen și aprecierea diversității în baza marcherilor proteici (hordeinelor), enzimatici (peroxidazelor, polifenoloxidazelor), moleculari (PR-5).

**Implementarea rezultatelor științifice.** Studiile comparative ale diversității induse de fitovirusuri au stabilit generarea unui polimorfism genetic după mai multe caractere cantitative și calitative în baza cărora au fost **elaborate procedee de extindere a variabilității genetice** prin utilizarea solitară a infecțiilor virale sau în asociere cu razele gama / cultura *in vitro*, procedee de obținere a recombinanților pentru diferite plante de cultură (tomate, orz, varză) [1; 3; 6]. Rezultatele cercetărilor au fost aplicate în obținerea de forme noi de tomate (2 acte de implementare, 2 brevete de soi de plantă). Realizările obținute au servit ca suport metodologic pentru asigurarea cursurilor *Biologia celulară*, *Histologie vegetală* și lucrărilor practice *Metode citologice de examinare a celulelor și țesuturilor* destinate studenților ciclului I și II, Universitatea de Stat din Moldova.

**Aprobarea rezultatelor științifice.** Rezultatele și concluziile principale obținute la tema tezei au fost comunicate și discutate în cadrul a 32 manifestații științifice din țară, inclusiv 16 peste hotare (România, Federația Rusă, Franța).

**Publicații la tema tezei.** Principalele rezultate sunt expuse în 74 lucrări, inclusiv: 1 monografie, 7 articole în reviste recenzate din străinătate, 9 articole în reviste incluse în Registrul Național al revistelor de profil, 22 articole în culegeri științifice, 22



teze la manifestări științifice, 5 brevete de invenție, inclusiv 2 pentru soi de plantă, 1 îndrumare metodică.

**Volumul și structura lucrării.** Teza include introducere, 6 capitole, concluzii generale, recomandări practice, bibliografie (490 surse), 8 anexe. Lucrarea este expusă pe 209 pagini text de bază, conține 45 tabele și 54 figuri.

**Cuvinte cheie:** citogenetică, plante de cultură, virusuri, recombinare meiotică, recombinare somatică, marcheri proteici, microsporogeneză, patogeneză virală, ultrastructură, variabilitate genetică.

## CONȚINUTUL TEZEI

**INTRODUCERE.** Este prezentată caracteristica succintă a lucrării; inclusiv este descrisă actualitatea și importanța problemei abordate, scopul și obiectivele cercetărilor, ipoteza de cercetare, noutatea științifică și valoarea aplicativă a rezultatelor obținute, aprobarea rezultatelor, sumarul compartimentelor tezei.

### 1. CITOGENETICA PATOGENEZEI VIRALE

Este expusă analiza literaturii de specialitate la nivel național și mondial, fiind prezentată sinteza informației privitor la:

- organizarea moleculară a fitovirusurilor și strategiile de expresie a genelor virale, mecanismele de reacție a plantelor la infectare cu virusuri;
- tipurile de rezistență și factorii ce determină sensibilitatea declanșată de efecte; impactul infecțiilor virale la plantele gazdă la nivel structural și funcțional;
- analiza factorii ce influențează proliferarea celulară și inductorii diversității genetice la plante.

Lipsa datelor privind aspectele citogenetice ale virozelor și impactul virusurilor asupra proliferărilor celulare, evenimente ce stau la baza variabilității genetice, precum și a influenței agenților virali asupra descendenților plantelor infectate, a determinat indentificarea obiectivelor - reper pentru evaluarea patogenezei virale la sistemele gazdă-patogen formate în baza virusurilor cu diferite tipuri de genomuri (ADN, ARN) și strategii de replicare.

### 2. MATERIALELE ȘI METODELE DE CERCETARE

Cercetările incluse în teză au fost realizate în cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor în perioada 1994-2018, în condiții de laborator (Laboratorul Biotehnologii Vegetale), solariu și câmp. Studiile au fost organizate pe 32 sisteme gazdă-patogen, create luând în considerare particularitățile agentului viral (ADN - virusul mozaicului conopidei, VMCo și ARN - virusul mozaicului tutunului, VMT; virusul aspermiei tomatelor, VAT; virusul X al cartofului, VXC; virusul mozaicului dungat al orzului, VMDO) și spectrul speciilor gazdă (culturi autogame). În calitate de gazde au servit 8 genotipuri de tomate dintre care 6 sensibile la VAT, VXC, VMT, 3 soiuri de orz de primăvară susceptibile la VMDO și 7 soiuri de varză cu sensibilitate la VMCo.

Metodele de studiu ale aspectelor citogenetice a patogenezei virale au fost selectate, ținând cont de specificitatea fiecărei sisteme gazdă-patogen și particularitățile biologice ale taxonilor (Figura 2). Pentru realizarea obiectivelor trasate au fost utilizate

**metode virusologice de diagnostic** și studiu al agenților virali (metoda de inoculare mecanică a plantelor experimentale), metoda de contrastare negativă bazată pe microscopia electronică prin transmisie (Hitchborn, Hills, 1965), metoda imunoenzimatică (Clark, Adams, 1977).

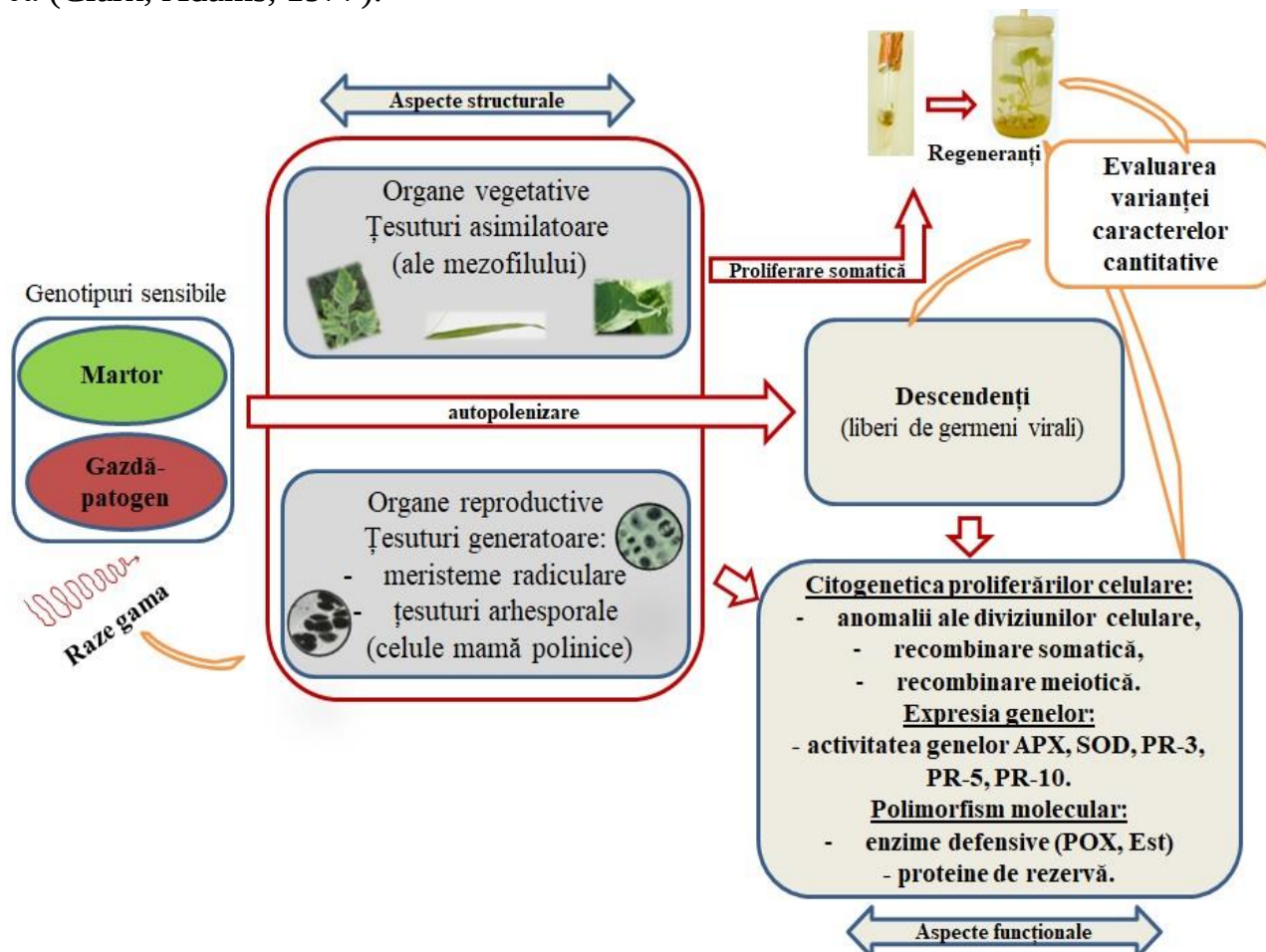


Fig. 2. Schema metodologică a cercetărilor.

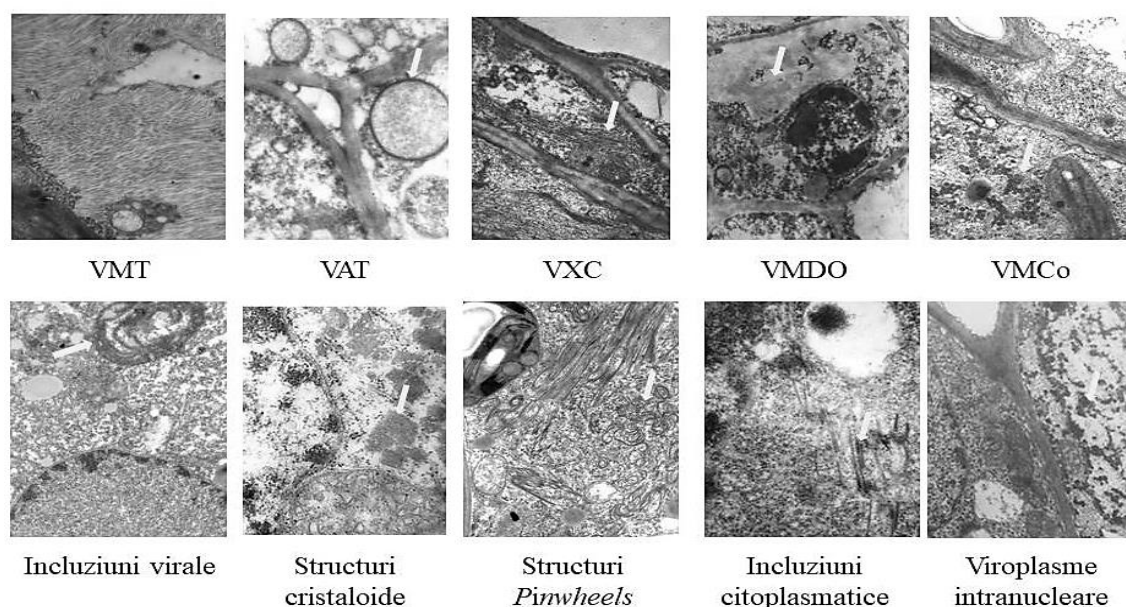
Pentru **inducerea variabilității genetice** au fost aplicate metoda culturii *in vitro* și mutageneză experimentală. Regularitatea **diviziunilor mitotice și meiotice**, inclusiv **recombinarea somatică și meiotică** au fost evaluate conform Imai H., Moriwaki K. (1982) și Panda K. și coaut. (1996). Pentru aprecierea impactului infecțiilor virale asupra plantelor gazdă au fost utilizate **metode biochimice de studiu** (polimorfismul peroxidazelor și esterazelor după Swiecicki W., 2000, proteinelor de rezervă, conform Shewry P. și coaut., 1978). Conținutul substanțelor uscate în fructe și frunze a fost determinat prin metoda uscării în etuvă (Ермаков А. и др., 1987). Aprecierea valorică a caracterelor cantitative a fost realizată cu ajutorul **metodelor biometrice** după ghidurile UPOV aprobate pentru fiecare cultură. Evaluarea nivelului de expresie a unor gene asociate patogenezei și potențialului oxidativ a fost realizată prin **Revers Transcripție PCR**, iar **concentrația relativă a transcripturilor** genelor analizate față de gena de referință a fost calculată după Livak K. și Schmittgen T. (2001). Pentru aprecierea rolului genotipului, virusului, interacțiunii acestora în sursa de variație a caracterelor cantitative a fost aplicată analiza bi- și trifactorială a **varianței ANOVA**. **Prelucrarea statistică** a datelor s-a efectuat cu ajutorul pachetelor de programe Statgraphics Plus 2.1, Statistica 7.0.

### 3. EXPRESII CITOPATOLOGICE ALE VIROZELOR LA PLANTELE DE CULTURĂ

Fiind paraziți obligatori, virusurile sunt în dependență totală plastică și energetică de celulele vii infectate. Doar pătrunderea particulelor virale în interiorul celulelor produce modificări morfostructurale denumite simptome primare. Multiplicarea și distribuirea agentului patogen prin organele plantei generează vaste reorganizări ale structurii interne exteriorizate macroscopic.

#### 3.1.Reacții citopatice induse de viroze la tomate

La infectarea tomatelor cu VAT, VMT, VXC, soiurile incluse în cercetare au prezentat simptome exterioare de boală la a 14-15-a zi după infectare, care în următoarele săptămâni s-au aprofundat semnificativ, exprimându-se prin pete verzui gălbui, care alternau cu porțiuni de culoare verde marmorată. Gradul de încrețire, deformare a limbului frunzelor, componentelor organelor reproductive (petalelor, anterelor, pistilurilor) a variat în dependență de agresivitatea virusului și reacția genotipului. Specia *S. pimpinellifolium* și varietatea spontană *S. racemigerum* nu au prezentat simptome exterioare de boală, cu toate că particulele virusurilor au fost identificate în țesuturile frunzelor și componentele butonilor florali (sepale, petale, antere) [2]. Prin analiza ultrastructurală virioni au fost detectați dispersat sau în acumulări în citoplasma celulelor mezofilului, sepalelor, peretelui anterelor, ultimele prezentând un grad mai intens de concentrare a particulelor. Modificările structurale descrise în patosistemele create dintre tomate și VMT, VXC sau VAT au prezentat trăsături similare, fiind remarcate deosebiri în gradul de expresie (Figura 3).



**Fig. 3. Structuri specifice induse de infecțiile virale în sistemele virus-gază analizate.**

Organitele sistemului energetic, mitocondriile și plastidele, au expus reliefări mai puternice la soiul susceptibil Elvira, comparativ cu specia *S. pimpinellifolium* sau forma *S. racemigerum*. În cazul infectării cu VAT, virionii erau vizualizați în apropierea sau în matricea plastidelor. Localizarea în interiorul organelor este o dovadă a supoziției conform căreia virusurile din genul *Cucumovirus* utilizează membranele tilacoidale în replicarea

genomului viral, iar matricea plastidiană în asamblarea particulelor virale [52; 58]. Este important de remarcat, că și în plastidele formelor spontane puteau fi vizualizate conglomerări ale particulelor virale, totodată fiind păstrată integritatea morfostructurală [49]. Complementar particulelor virale în celulele infectate, cu o frecvență mai majoră în țesutul tapetal și endoteciul erau atestate structuri, precum agregatele cristaloide specifice VAT, incluziuni concentrice membranare, *Pinwheels*, caracteristice VXC, formațiuni membranare, care sunt considerate suport pentru fixarea complexului reproductiv viral.

În celulele mezofilului, endoteciului și tapetumului ale plantelor infectate cu VMT, VXC, VAT nucleolele au prezentat redistribuiri și modificări în compactizarea cromatinei, cu prevalarea heterocromatinei perimembranare, zonă în care sunt distribuite secvențele telomerice și centromerice, iar sporirea gradului de condensare denotă o diminuare a activității nucleului. În special la s. Fachel și s. Elvira nucleolii dețineau o structură compactă, ce reprezintă, de asemenea, un indice al reprimării proceselor de sinteză a precursorilor ARN ribozomali. La varietatea *S. pimpinellifolium* se atestau nucleoli de tip nucleolar, precum și o compactizare mai redusă a cromatinei, ceea ce demonstrează o activitate transcripțională ridicată. În celulele acestui sistem citopatic a fost remarcat un număr de mitocondrii cu structură normală mai major față de celulele soiurilor infectate cu același virus. Organitele sistemului vacuolar (aparatură Golgi, reticulul endoplasmatic, lizozomii, precum și vacuomul) au expus un grad diferit de reorganizare, cu aprofundarea restructurărilor la soiurile susceptibile (Fachel, Elvira) și un nivel mai redus la formele spontane (*S. pimpinellifolium* și *S. racemigerum*). În cadrul aceleiași celule au fost atestate organite cu diferită profunzime a modificărilor structurale: fragmentarea cisternelor reticulului endoplasmatic, pierderea ribozomilor, dar și canalicule morfologic normale cu ribozomi atașați.

Tabloul ultrastructural este o reflecție a reacțiilor concurenționale dintre metabolismul propriu al celulei și cel de reprogramare în susținerea reproducerii componentelor virali. Aspectele morfologice vizualizate sunt o dovadă a capacității majore de menținere a integrității structurale la gentipurile spontane (*S. pimpinellifolium* și *S. racemigerum*). Soiurile susceptibile (Fachel, Elvira) au prezentat vulnerabilitate la viroze cu menținerea capacității de asigurare a proceselor productive ale infecțiilor virale [2]. Apreciind spectrul reorganizărilor organitelor celulare, poate fi scos în evidență caracterul nespecific al reacțiilor provocate de VAT, VXC sau VMT. Modificări similare pot fi atestate atât pentru factori biotici, cât și abiotici [42].

Formarea grăuncioarelor de polen și activitatea gametofitului masculin sunt o dovadă sigură a stării de funcționalitate și derulare normală a etapelor ontogenetice. În sistemele patologice analizate, infecțiile provocate de VAT, VXC și VMT au fost însoțite de acumularea particulelor acestor virusuri în celulele mezofilului și endoteciului, tapetumului, indiferent de tipul reacției la patogen (susceptibilitate sau toleranță). Totodată în toate sistemele gazdă-virus germenii virali nu au fost identificați în interiorul sau pe suprafața grăuncioarelor de polen. În același timp, formarea microsporilor în condiții de patogeneză a generat multiple reconfurmări în structura internă a acestora. În cadrul aceleiași antere au fost vizualizați microspori cu diferit grad de expresie al reorganizărilor interne. Grăuncioare de polen cu structură tipică etapei de microspori bicelulari ce dețineau celula vegetativă și germinativă au fost remarcate în anterele plantelor sănătoase, dar și a celor infectate cu virusuri, însă cu o frecvență mai redusă. În toate variantele experimentale au fost

atestate modificări cu caracter similar, dar cu un grad diferit de manifestare: i) microspori lipsiți de celula germinativă, cu reorganizări ale organelor celulei vegetative, ii) microspori cu resturi de conținut citoplasmatic și organite solitare, iii) grăuncioare de polen lipsite complet de conținutul intern, dar care păstrau forma tipică.

### **3.2. Aspecte ultrastructurale ale celulelor mezofilului la orz în cazul infectării cu virusul mozaicului dungat al orzului**

Infectarea plantelor de orz cu VMDO a condus la multiple modificări ale structurii interne ale celulelor fotosintetice active (celulelor mezofilului), dar și a organelor reproductive (celulelor endoteciului, țesutului tapetal). Soiurile de orz analizate, Galactic, Sonor și Unirea au prezentat sensibilitate la VMDO, fiind gazde pentru reproducerea, asamblarea și propagarea sistemică a virionilor în toate organele plantei. Particulele virale se întâlneau solitar sau în mici conglomerări, care în majoritatea cazurilor păstrau contactul cu tonoplastul. Caracteristic pentru sistemele citopatice analizate este fragmentarea cisternelor reticulului endoplasmatic, precum și ale elementelor dictiozomilor. Aceste constatări indică reprimarea proceselor de biosinteză a compușilor de export, citomembranari, precum și a traficului intracelular.

În celulele țesuturilor de protecție (epidermă) și trofice (endoteciu, stratul tapetal), virionii VMDO aveau o distribuție similară celor ale mezofilului, manifestând preferință pentru vacuole ca sediu de stocare. În ce privește gradul de expresie, reorganizările intracelulare au fost mai profunde în celulele endoteciului, unde au fost depistate acumulări masive de particule virale, precum și degradarea integrității structurale, fragmentarea cisternelor reticulului endoplasmatic, vacuolizarea cisternelor aparatului Golgi. Nucleele au prezentat distribuții neuniforme ale heterocromatinei, acumulări masive preferențial în zona perinucleară, care au fost mai accentuate la s. Galactic. Nucleolii au fost puternic compactizați, indicând o inhibare a sintezei componentelor ribozomali. Extinderea spațiului perimembranar, vizualizată pentru majoritatea nucleelor, denotă perturbări în procesele de schimb nucleo-plasmatic. În morfologia mitocondriilor au fost stabilite afectări structurale mai puțin evidențiate, ceea ce este o dovadă a necesității energetice majore în aceste sisteme și asistarea acestei funcții. În celulele mezofilului și ale peretelui anterelor se atestă acumularea excesivă a peroxizomilor. Prezența într-un număr mai mare a acestor organite în țesuturile lipsite de fotosinteză este legată de sporirea funcțiilor de oxidare și detoxifiere.

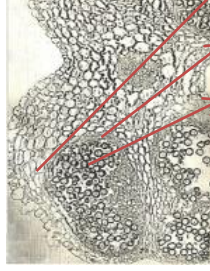
Studiile ultrastructurale ale microsporilor formați în condițiile patogenezei virale demonstrează modificări ale structurii interne, inclusiv lipsa germenilor virali în grăuncioarele de polen, confirmând datele din literatura de specialitate privitor la infectarea microsporilor cu VMDO în dependență de tulpina virusului și particularitățile gazdei [43]. Pentru genotipurile analizate (soiurile Galactic, Sonor și Unirea) nu a fost identificată capacitatea de afectare a grăuncioarelor de polen, cu toate acestea țesuturile sterile ale anterei conțineau într-o cantitate apreciabilă particule virale. Citoplasma celulelor vegetative era puternic destructurată, la fel și organitele celulare au suferit multiple reorganizări: fragmentarea și vacuolizarea cisternelor reticulului endoplasmatic, destrucția ergastoplasmelor. Ca rezultat al compactizării accentuate a mitocondriilor, acestea se vizualizau ca structuri preferențial sferice și opace. De asemenea s-a înregistrat reducerea plastidelor și a acumulărilor de amidon.

### 3.3. Citopatologia celulelor mezofilului la plantele de varză infectate cu virusul mozaicului conopidei

În baza cercetărilor electronomicroscopice ale mezofilului genotipurilor de varză a fost stabilită prezența particulelor virale în citoplasmă, iar în cantități majore în nucleee. Distribuția virionilor printre materialul genetic al gazdei a indus modificări ale formei și structurii interne ale nucleelor. În citoplasma celulelor infectate, germenii VMCo apăreau în formă de particule sferice, opace, care formau deseori conglomerări de diferită formă și mărime sau viroplasmе – structuri virale specifice.

În endostructura celulelor la plantele infectate a fost constatată o eterogenitate a întregului statut organelar, fiind remarcate distrucții de diferit grad ale nucleelor, mitocondriilor, plastidelor, reticulului endoplasmatic. În nucleee se atestă majorarea zonelor de heterocromatină în special spre periferie. În celulele puternic afectate, reorganizările structurale ale nucleelor au atins un grad major, fiind înregistrată aglutinarea cromatinei, extinderea puternică a spațiului perimembranar, modificări cu caracter ireversibil, care ulterior duc la moartea celulară. În cazul infecției virale a fost relevată vacuolizarea mitocondriilor și inducerea sau inhibarea proceselor mitocondriale într-o manieră extrem de specifică, cu revizuirea funcției organitei care reflectă strategia de utilizare a mitocondriilor în multiplicarea și producerea descendenților virali. O reacție specifică la VMCo reprezintă formarea corpiilor de tip mielinic, structurilor multiveziculare, sporirea incluziunilor fenolice, rarefierea citoplasmei și apariția punților citoplasmice (Figura 3, Tabelul 3). Aceste modificări poartă caracter stereotipic pentru factorii cu puternic impact stresogen și au efect compensatoriu în producerea răspunsului la patogeni, factori abiotici, îmbătrânire [12].

**Tabelul 3. Răspunsuri specifice la infecțiile virale în dependență de specificul tisular și intracelular al sistemului gazdă-patogen**

| Specia gazdă           | Nivel de organ                                                                                                      | Nivel tisular        | Incluziuni virale                                                                                                                      | Formațiuni structurale                 |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Tomate<br>Orz<br>Varză | Organe vegetative (frunze)<br>   | Țesut al mezofilului | Particule sferice VAT<br><i>Localizare intracelulară:</i> hialoplasmă; spațiul intramembranar, matricea mitocondriilor și plastidelor. | Formațiuni cristalinoide citoplasmice  |
|                        |                                                                                                                     |                      | Particule liniare ale VMT<br><i>Localizare intracelulară:</i> hialoplasmă, vacuolă.                                                    | Structuri membranare                   |
|                        |                                                                                                                     |                      | Particule filamentoase ale VXC<br><i>Localizare intracelulară:</i> hialoplasmă.                                                        | Structuri Pin-wheels                   |
| Tomate<br>Orz          | Organe reproductive (antere)<br> | Endoteciu            | Particule filamentoase ale VMDO<br><i>Localizare intracelulară:</i> hialoplasmă.                                                       | Structuri membranare                   |
|                        |                                                                                                                     | Tesut tapetal        | Particule sferice VMCo<br><i>Localizare intracelulară:</i> hialoplasmă; intranuclear.                                                  | Formațiuni cristalinoide intranucleare |
|                        |                                                                                                                     | Microspori           | Nu au fost înregistrate.                                                                                                               | Nu au fost înregistrate                |



Generalizând rezultatele analizei morfostructurale putem scoate în evidență caracterul specific al modificărilor cauzate de infecțiile virale, gradul cărora este influențat de reacția gazdei. În toate sistemele citopatice analizate a fost stabilită o eterogenitate a restructurărilor în cadrul aceluiasi țesut, precum și celulă. Profunditatea reorganizărilor a fost mai accentuată la genotipurile susceptibilitate comparativ cu formele spontane. Genotipurile tolerante s-au distins prin sporirea numărului de peroxizomi și menținerea integrității organitelor sistemului energetic (mitocondriilor și plastidelor) și deținerea unui număr mai sporit de microspori cu structură normală.

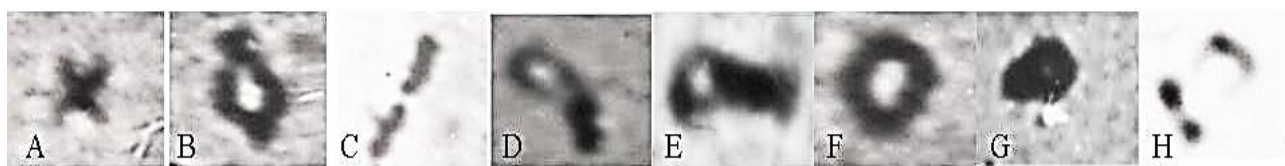
#### 4. MICROSPOROGENEZA LA TOMATE ȘI ORZ ÎN CONDIȚII DE PATOGENEZĂ VIRALĂ

##### 4.1. Studiul procesului de meioză la tomate în condiții de patogeneză virală

Meioza este un tip specific de diviziune diferențiată ce are la bază două cicluri de reproducere precedate de o singură repriză de replicare a ADN-lui, procese menite să asigure obiective diametral opuse – stabilitatea genomului și inducerea variabilității genetice [53]. Meioza generează diversitate prin două evenimente: recombinarea și segregarea aleatorie a cromozomilor. Majorarea frecvenței recombinărilor este o prioritate în programele de ameliorare ce vizează crearea de genotipuri cu noi combinații de gene.

**Particularitățile recombinării meiotice la tomatele infectate cu virusuri.** Potrivit unor autori [75] după coraportul dintre diferite tipuri de bivalenți în profaza I meiotică pot fi apreciate modificările în generarea variabilității genetice, iar estimarea distribuției chiasmelor în diploten - diachineză poate fi o metodă sigură de estimare a impactului factorilor genetici și de mediu asupra nivelului și spectrului de recombinări [50]. Numărul și distribuția chiasmelor, care se consideră expresie citologică a *crossing-over*-ului, reflectă locul și gradul recombinării meiotice.

Evaluarea tipurilor de bivalenți conform locului realizării conjugării a permis estimarea frecvenței *crossing-over*-ului în regiunile interstițiale și cele telomerice (Figura 4.1).



**Fig. 4.1. Reprezentarea diferitelor tipuri de bivalenți la tomate (*S. lycopersicum* L.):**

- A) bivalent cu o chiasmă interstițială (I); B) bivalent cu două chiasme interstițiale (II); C) bivalent cu o chiasmă terminală (T); D) bivalent cu o chiasmă terminală și una interstițială (T+I); E) bivalent cu o chiasmă terminală și două interstițiale (T+II); F) bivalent cu două chiasme terminale (II); G) bivalent cu două chiasme terminale și una interstițială (TT+I); H) univalenți (0)(x 1500).

Conform rezultatelor obținute, soiurile analizate de tomate au reacționat la infectarea cu VAT, VXC, aplicarea separată a razelor gama sau în asociere cu infecția virală prin modificarea numărului de chiasme per celulă mamă polinică (CMP) (Tabelul 4.1).

**Tabelul 4.1. Valoarea medie a numărului de chiasme per celulă mamă polinică la tomatele sănătoase, infectate cu virusuri și iradiate cu raze gama**

| Genotip | Variantă            | Tip chiasme    |                 |                 |
|---------|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|         |                     | interstițiale  | terminale       | chiasme totale  |
| Fachel  | <b>martor</b>       | 4,035±0,153    | 12,655±0,273    | 16,690±0,249    |
|         | <b>VAT</b>          | 6,414±0,182*** | 13,862±0,297**  | 20,276±0,371*** |
|         | <b>VXC</b>          | 3,586±0,176*   | 13,828±0,179*** | 17,379±0,175**  |
|         | <b>radiație</b>     | 4,207±0,175    | 12,621±0,287    | 16,828±0,253    |
|         | <b>VAT+radiație</b> | 5,862±0,177*** | 13,276±0,318    | 19,138±0,389*** |
|         | <b>VXC+radiație</b> | 3,552±0,169*   | 13,828±0,179*** | 17,345±0,174**  |
| Nistru  | <b>martor</b>       | 3,690±0,233    | 13,966±0,246    | 17,655±0,278    |
|         | <b>VAT</b>          | 5,172±0,165*** | 12,589±0,331*** | 17,793±0,379    |
|         | <b>VXC</b>          | 3,724±0,178    | 14,034±0,219    | 17,759±0,288    |
|         | <b>radiație</b>     | 3,828±0,211    | 14,241±0,241    | 18,069±0,293    |
|         | <b>VAT+radiație</b> | 5,276±0,163*** | 12,897±0,303**  | 18,207±0,315    |
|         | <b>VXC+radiație</b> | 3,897±0,188    | 14,276±0,243    | 18,172±0,306    |
| Prizior | <b>martor</b>       | 3,931±0,297    | 13,279±0,289    | 17,172±0,289    |
|         | <b>VAT</b>          | 6,483±0,346*** | 11,897±0,323*** | 18,345±0,337**  |
|         | <b>VXC</b>          | 4,759±0,177*   | 13,655±0,281    | 18,345±0,229*** |
|         | <b>radiație</b>     | 4,138±0,279    | 13,862±0,271    | 17,966±0,287*   |
|         | <b>VAT+radiație</b> | 6,310±0,302*** | 12,276±0,313**  | 18,552±0,339**  |
|         | <b>VXC+radiație</b> | 5,201±0,167*** | 13,552±0,283    | 18,724±0,289*** |

\*, \*\*, \*\*\* - diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,05$ ; 0,01; 0,001, respectiv.

Diferențe în variația numărului total al chiasmelor au fost înregistrate la s. Fachel și s. Prizior infectate cu VAT sau VXC separat sau în asociere cu razele gama. La s. Nistru se constată modificări semnificative doar la plantele infectate cu VAT. Majorarea numărului de chiasme interstițiale la genotipul menționat a fost însoțită de micșorarea numărului de chiasme terminale, ceea ce a și determinat lipsa suportului statistic pentru variația valorii totale a chiasmelor în unele variante. O situație similară a fost remarcată și în cazul iradierii plantelor s. Nistru infectate cu VAT. Tendințe de majorare a chiasmelor interstițiale urmate de reducerea celor terminale au fost descrise și la s. Prizior, în timp ce la s. Fachel factorii analizați au indus majorarea atât a chiasmelor interstițiale, cât și a celor terminale [21]. Cele mai semnificative diferențe au fost înregistrate la combinațiile gazdă-patogen cu utilizarea VAT. Impactul cauzat de VAT a fost mai accentuat decât cel generat de către VXC sau razele gama în doza 20 kR. Aplicarea testului Anova a scos în evidență variația chiasmelor interstițiale per CMP în dependență de infecția virală în proporție de 33,26%, genotipul deținând o putere de influență la nivel de 5,14%.

În baza analizei clusteriene au fost remarcate interrelații deosebite între diferite tipuri de bivalenți în varianta „Virus” comparativ cu „Martorul” (Figura 4.2). Redistribuirea chiasmelor și modificarea raportului dintre diferite tipuri de bivalenți se atestă la toate genotipurile de tomate analizate în cazul infectării cu virusuri [28]. Astfel, valoarea totală a chiasmelor la plantele martor și infectate este determinată de către chiasmele terminale, în special cele de tipul „T”, cota cărora per CMP predomină. Efectul citogenetic indus de VAT a cauzat modificări ale tipurilor de bivalenți conjugați în regiunile interstițiale, rata lor fiind direct influențată în special de cei joncționați în re-



giunea telomerică. Dacă la plantele martor, apariția univalenților este asociată cu tipul de bivalenții cu două chiasme interstițiale, sub acțiunea infecției virale formarea univalenților este influențată primordial de tipurile „T+II” și „I”.

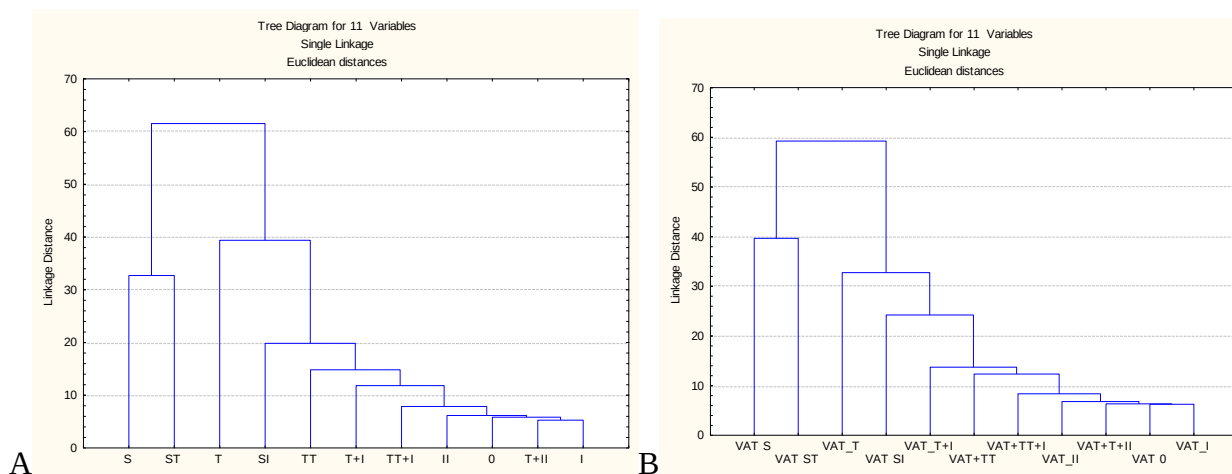


Fig. 4.2. Distribuția tipurilor de bivalenți la genotipurile analizate ale plantelor sănătoase (A) și infectate cu virusuri (B).

**Recombinarea meiotică la descendenții tomatelor infectate cu virusuri.** Derularea evenimentelor meiotice în condiții de patogeneză a condiționat la descendenții plantelor infectate modificări ale coraportului dintre numărul de chiasme terminale și interstițiale per CMP, având la bază majorarea frecvenței bivalenților cu o chiasmă interstițială, precum și a celor cu una sau două terminale și una interstițială. Aceste schimbări au fost asistate de efecte compensatorii de reducere a cotei bivalenților de tipul „TT” și „T+II”, ceea ce în final a condus la modificarea sumei chiasmelor după poziția deținută (interstițială sau terminală), cea totală fiind neschimbată (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Frecvența tipurilor de bivalenți per celulă mamă polinică la descendenții sănătoși ai tomatelor infectate cu VAT

| Tip bivalenți | Nistru       |               | <i>S. racemigerum</i> |               |
|---------------|--------------|---------------|-----------------------|---------------|
|               | martor       | descendenți   | martor                | descendenți   |
| I             | 0,379±0,092  | 0,483±0,107*  | 0,413±0,091           | 0,517±0,107*  |
| II            | 0,414±0,093  | 0,483±0,094   | 0,480±0,085           | 0,552±0,106   |
| T             | 6,966±0,240  | 6,793±0,235   | 6,689±0,205           | 6,414±0,265   |
| T+I           | 1,345±0,181  | 1,379±0,188   | 1,448±0,182           | 1,413±0,182   |
| T+II          | 0,207±0,091  | 0,172±0,071   | 0,241±0,095           | 0,206±0,077   |
| TT            | 1,655±0,159  | 1,552±0,169   | 1,689±0,158           | 1,586±0,153   |
| TT+I          | 0,552±0,106  | 0,655±0,114*  | 0,586±0,105           | 0,724±0,121** |
| 0             | 0,345±0,089  | 0,413±0,105*  | 0,414±0,087           | 0,483±0,118*  |
| SI            | 3,310±0,199  | 3,689±0,238*  | 3,724±0,243           | 4,001±0,262*  |
| ST            | 12,759±0,246 | 12,621±0,235  | 12,662±0,271          | 12,517±0,261  |
| S             | 16,069±0,285 | 16,241±0,279* | 16,352±0,379          | 16,414±0,287* |

\*, \*\*; - diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,05$ ; 0,01, respectiv.

În cazul toleranței, variații semnificative au fost stabilite pentru bivalenții cu una și două chiasme interstițiale. Majorarea schimburilor recombinogene în zonă interstițială a fost complementată de reducerea celor terminale. Datele experimentale permit să concluzionăm, că în urma infectării genotipurilor studiate are loc atât redistribuirea, cât și inducerea unor noi schimburi de segmente cromatidice. Asemenea redistribuire are o mare semnificație, deoarece conduce la mărirea recombinării genelor localizate în ace-

leași grupuri de *linkage*. De asemenea este cunoscut, că frecvența recombinării meiotice este diferită de-a lungul cromozomilor, fiind restricționată în regiunile conservate precum zona centromerului și regiunile telomerice [26].

Amplitudinea redusă a fluctuațiilor valorilor medii ale chiasmelor este determinată de modificările stabilite în coraportul diferitelor tipuri de bivalenți. Atât în variantele mar-tor, cât și în cele experimentale mai frecvenți au fost bivalenții ce dețin una sau două chi-asme în regiunea telomerică. Este important de menționat, că infecția virală a indus în ge-nerația liberă de virusuri modificări ce au cauzat sporirea chiasmelor interstițiale, dar și creșterea numărului de univalenți, care constituie rezultat al asinapsiei sau desinapsiei, evenimente cu efect compensator intercromozomal în reglarea recombinării meiotice [59].

#### 4.2. Studiul procesului de meioză la orzul de primăvară în condiții de pato-geneză virală

**Particularitățile recombinării meiotice la plantele de orz infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului.** În conformitate cu poziția chiasmelor de-a lungul brațelor cromozomale a fost apreciată frecvența diferitelor tipuri de bivalenți (Figura 4.3).



**Fig. 4.3. Reprezentarea diferitelor tipuri de bivalenți la orz (*H. vulgare* L.): A) bivalent cu o chiasmă interstițială; B) bivalent cu două chiasme interstițiale; C) bivalent cu o chiasmă terminală și una interstițială; D) bivalent cu o chiasmă terminală și trei interstițiale; E) bivalent cu două chiasme terminale; F) bivalent cu două chiasme terminale și una interstițială; G) univalenți (x 1500).**

În meiocitele de orz mai frecvent erau vizualizați bivalenți asociați la un capăt telomeric, precum și conjugați prin două chiasme – una telomerică și una interstițială. La cele trei soiuri analizate infecția virală a condiționat modificări statistic apreciable [17]. Micșorarea frecvenței bivalenților de tipul „II” și „T” a fost însoțită de majorarea ratei celor cu două sau trei chiasme interstițiale (tipul „T+II” și „T+III”), iar frecvența bivalenților asociați la capetele telomerice s-a redus substanțial. Asemenea modificări în distribuția chiasmelor denotă elocvent nu doar redistribuirea coeziunilor dintre cromatidele surori, dar și inducerea de schimburi suplimentare (Tabelul 4.3).

**Tabelul 4.3. Frecvența tipurilor de bivalenți per celulă mamă polinică la plantele de orz sănă-toase și infectate cu VMDO**

| Tipuri de bivalenți | Galactic    |                 | Sonor       |                 | Unirea      |                 |
|---------------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
|                     | Martor      | VMDO            | Martor      | VMDO            | Martor      | VMDO            |
| <b>I</b>            | 0,207±0,077 | 0,208±0,076     | 0,172±0,071 | 0,241±0,081     | 0,276±0,084 | 0,241±0,081     |
| <b>II</b>           | 0,448±0,094 | 0,138±0,065 **  | 0,483±0,094 | 0,172±0,071 **  | 0,448±0,094 | 0,241±0,080*    |
| <b>T</b>            | 1,345±0,143 | 1,103±0,143     | 1,310±0,014 | 1,069±0,139     | 1,552±0,127 | 1,001±0,149     |
| <b>T+I</b>          | 2,207±0,135 | 2,310±0,158*    | 2,241±0,146 | 2,379±0,168     | 2,310±0,132 | 2,448±0,137     |
| <b>T+II</b>         | 0,828±0,122 | 1,517±0,118 *** | 0,172±0,071 | 1,517±0,118 *** | 0,758±0,128 | 1,552±0,106 *** |
| <b>T+III</b>        | 0,103±0,058 | 0,448±0,117 *** | 0,103±0,047 | 0,379±0,092 **  | 0,138±0,065 | 0,242±0,088 *   |
| <b>TT</b>           | 0,827±0,132 | 0,414±0,105 *** | 0,827±0,132 | 0,414±0,105*    | 0,689±0,123 | 0,414±0,105 *   |
| <b>TT+I</b>         | 0,931±0,148 | 0,655±0,103     | 0,931±0,148 | 0,689±0,112     | 0,724±0,139 | 0,586±0,106     |
| <b>O</b>            | 0,103±0,084 | 0,207±0,07*     | 0,069±0,048 | 0,172±0,071 **  | 0,103±0,056 | 0,207±0,077*    |
| <b>SI</b>           | 6,172±0,269 | 7,759±0,287***  | 6,276±0,257 | 7,828±0,254***  | 6,103±0,239 | 7,345±0,206 *** |
| <b>ST</b>           | 7,931±0,302 | 7,655±0,212**   | 7,966±0,308 | 7,689±0,233**   | 7,448±0,219 | 7,379±0,201 *   |
| <b>S</b>            | 14,07±0,22  | 15,41±0,304**   | 14,21±0,21  | 15,55±0,30**    | 13,52±0,18  | 14,76±0,214 *   |

\*, \*\*, \*\*\* - diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,05$ ; 0,01; 0,001, respectiv.

Analiza factorială a scos în evidență dependența prioritară a sumei totale a chiasmelor de tipul bivalenților în proporție de 77%. Puterea de influență a infecției virale constituie peste 9% ( $P \leq 0,001$ ). În sistemele analizate, caracterizate prin susceptibilitate la VMDO, genotipul în mod particular, precum și interacțiunea cu ceilalți factori analizați, nu reprezintă o sursă de variație a numărului total de chiasme.

**Aprecierea recombinării meiotice la descendenții soiurilor de orz infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului.** Sub influența infecției virale la descendenții celor trei soiuri analizate s-a constatat creșterea numărului coeziunilor interstițiale. Aceste perturbări au condus la majorarea numărului total de chiasme, cu toate că nivelul chiasmelor terminale a variat nesemnificativ (Tabelul 4.4).

**Tabelul 4.4. Valoarea medie a numărului de chiasme per celulă mamă polinică la descendenții de orz obținuți de la plante sănătoase și infectate cu VMDO**

| Genotip     | Variantă | Tip chiasme    |             |                           |
|-------------|----------|----------------|-------------|---------------------------|
|             |          | interstițiale  | terminale   | terminale + interstițiale |
| s. Galactic | martor   | 5,947±0,197    | 7,748±0,286 | 13,684±0,223              |
|             | VMDO     | 7,336±0,262 ** | 7,662±0,298 | 14,975±0,328**            |
| s. Sonor    | martor   | 6,148±0,176    | 7,544±0,386 | 13,689±0,259              |
|             | VMDO     | 7,389±0,248*   | 7,701±0,241 | 15,088±0,327*             |
| s. Unirea   | martor   | 6,245±0,221    | 7,128±0,194 | 13,368±0,254              |
|             | VMDO     | 7,021±0,316*   | 7,245±0,246 | 14,162±0,260*             |

\*, \*\* - diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,05$ ; 0,01, respectiv.

Conform analizei clusteriene, numărul total al chiasmelor la plantele martor sunt determinate de coeziunile poziționate în regiunile telomerice [13]. La descendenții plantelor infectate se atestă schimbări în distribuția chiasmelor interstițiale, precum și inducerea de noi coeziuni sinaptice. Suma totală a chiasmelor la variantele experimentale analizate este dependentă prioritar de bivalenții două sau trei chiasme interstițiale de tipul „T+II”, „T+III”.

La descendenții plantelor infectate, similar variantelor virozate, generarea de noi schimburi de-a lungul brațelor cromozomale a fost însoțită de creșterea univalenților. Redistribuirea chiasmelor are o mare importanță, deoarece duce la creșterea recombinărilor între genele localizate în aceleași grupuri de *linkage* [44]. Rezultatele noastre privind efectul VMDO asupra microsporogenezei la plantele de orz și descendenții acestora, prezintă date confirmative cu privire la perturbarea conjugării meiotice și efectul recombinogen ale agentului viral.

#### **4.3. Evaluarea citogenetică a microsporogenezei la plantele de tomate și orz în condiții de patogeneză virală**

**Evidența anomaliilor meiotice la plantele de tomate infectate cu virusuri și descendenții acestora.** Primele constatări privitor la unele anomalii în desfășurarea meiozei la plantele infectate cu virusuri în literatura de specialitate se remarcă acum 70 ani. Pe perioada următoarelor decenii, la această temă au fost efectuate studii sporadice, conform cărora se semnalează influența infecțiilor virale asupra sferei reproductive la diverse specii de plante. În vederea aprofundării cercetărilor referitor la aspectele

citogenetice ale patogenezei virale, prezintă interes studierea influenței germenilor virali comparativ cu radiațiile gama, factori ce provoacă restructurări ADN, modul de acțiune al cărora este amplu studiat.

Infectarea plantelor cu VAT a cauzat sporirea cotei aberațiilor de tipul: cromozomi retardatari, eliminări de cromozomi, punți cromatice și în consecință a procentului sumar de celule cu aberații (Tabelul 4.5).

**Tabelul 4.5. Frecvența anomaliilor meiotice la tomate în cazul infectării cu VAT, %**

| Soi     | Variantă | Faza diviziunii meiotice | CMP cu anomalii, % | Tipul anomaliilor meiotice |           |       |
|---------|----------|--------------------------|--------------------|----------------------------|-----------|-------|
|         |          |                          |                    | Eliminări                  | Retardări | Punți |
| Nistru  | Martor   | A-T I                    | 4,22               | 5,11                       | 4,00      | -     |
|         |          | A-T II                   | 4,06               | 5,31                       | 1,77      | -     |
|         | VAT      | A-T I                    | 23,88***           | 11,94                      | 18,91     | -     |
|         |          | A-T II                   | 39,01***           | 13,00                      | 15,38     | -     |
| Prizior | Martor   | A-T I                    | 4,52               | 3,70                       | 5,82      | -     |
|         |          | A-T II                   | 4,45               | 0,86                       | 3,00      | -     |
|         | VAT      | A-T I                    | 31,08***           | 26,51                      | 11,26     | 0,90  |
|         |          | A-T II                   | 42,68***           | 19,51                      | 11,79     | -     |
| Fachel  | Martor   | A-T I                    | 6,05               | 4,39                       | 5,70      | -     |
|         |          | A-T II                   | 5,52               | 3,97                       | 5,16      | -     |
|         | VAT      | A-T I                    | 29,23***           | 17,69                      | 6,92      | 6,99  |
|         |          | A-T II                   | 45,83***           | 8,33                       | 26,04     | 1,06  |

\*\*\* - diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,001$ .

Aberațiile cromozomale au avut o distribuție diferită în I diviziune comparativ cu cea de-a II-a. La martor, în A-T II procentul CMP anormale față de cel din prima diviziune a fost mai redus ( $P < 0,05$ ). Iradierea tomatelor sănătoase a determinat majorarea semnificativă a procentului total al celulelor cu aberații, cu o putere de acțiune de cca 60% mai redusă în cea de-a doua diviziune. În cazul influenței combinate a radiației și a unuia dintre virusuri, se constată o tendință similară de diminuare a frecvenței CMP cu aberații în A-T I comparativ cu A-T II, însă cu o amploare mai redusă (Tabelul 4.6).

**Tabelul 4.6. Frecvența celulelor mamă polinice cu aberații în cazul iradierii tomatelor sănătoase și infectate cu virusuri**

| Variantă       | Soiul Prizior |               | Soiul Fachel  |               |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                | A - T I       | A - T II      | A - T I       | A - T II      |
| Martor         | 7,82±1,22     | 7,13±1,03     | 9,63±1,23     | 9,54±1,06     |
| Razele gama    | 38,42±1,21*** | 23,20±0,37*** | 42,29±0,73*** | 25,25±0,85*** |
| VAT            | 30,65±0,99*** | 42,64±1,03*** | 29,13±1,22*** | 44,72±0,98*** |
| VAT + radiație | 67,70±0,94*** | 23,19±0,37*** | 58,59±1,22*** | 30,48±1,02*** |
| VXC            | 28,58±0,48*** | 30,65±0,99*** | 42,76±3,40*** | 42,29±0,73*** |
| VXC + radiație | 53,62±0,19*** | 19,69±0,92*** | 51,30±5,57*** | 20,67±1,25*** |

\*\*\* - diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,001$ .

Această diminuare se explică prin eliminarea CMP aberante și/sau ca urmare a unor procese de „reparare” a restructurărilor survenite în structura ADN-ului [68]. La plantele infectate efectul depresiv se aprofundează în A-T II, ceea ce poate fi explicat prin specificul condițiilor de patogeneză în care microsporogeneza evoluează în peri-

oada sintezei și acumulării în celulele anterei a agentului viral și destabilizării proceselor metabolice, iar infecția virală poate fi considerată sursă cu acțiune continuă [21].

Conform rezultatelor cercetărilor citogenetice în anafaza și telofaza diviziunilor I și II sub acțiunea razelor gama mai frecvent s-au atestat eliminări de cromozomi sau cromozomi retardatari, constatări atestate și de alți autori [30]. Un efect specific cauzat de infecțiile virale este înregistrat prin creșterea frecvenței CMP cu multiple aberații ( $P \leq 0,01$ ). Sporirea numărului de aberații în cadrul aceleiași celule polinice denotă o instabilitate a procesului de meioză [68]. Eliminările și retardările identificate în anafaza-telofaza timpurie pot conduce la formarea de micronuclei și, respectiv, la devieri ale distribuției echivalente a materialului genetic între celulele fiice. Se consideră, că prezența cromozomilor retardatari în A-T I este expresia citologică a unor restructurări de tipul duplicărilor sau deficiențelor [26], iar punțile cromatinice se formează în urma inversiilor [64]. Conform rezultatelor cercetărilor citogenetice, în anafaza și telofaza timpurie din diviziunile I și II mai frecvent s-au înregistrat eliminări de cromozomi sau cromozomi retardatari, iar punțile cromozomale sau cromatidice au fost remarcate doar la plantele virozate. Conform unor autori, punțile constituie expresie a inversiilor și sunt mai des atestate la formele cu înmulțire vegetativă, având rol major în sporirea variabilității genetice [64].

**Anomalii meiotice la descendenții tomatelor infectate.** Infecțiile virale au avut repercusiuni nesemnificative asupra microsporogenezei în următoarele generații. Cota celulelor cu restructurări în anafaza-telofaza I și II meiotică a prezentat valori comparabile cu varianta martor, majorări statistice fiind confirmate pentru frecvența aberațiilor per celulă (Tabelul 4.7).

**Tabelul 4.7. Rata celulelor normale și spectrul aberațiilor meiotice în A-T I la descendenții tomatelor infectate**

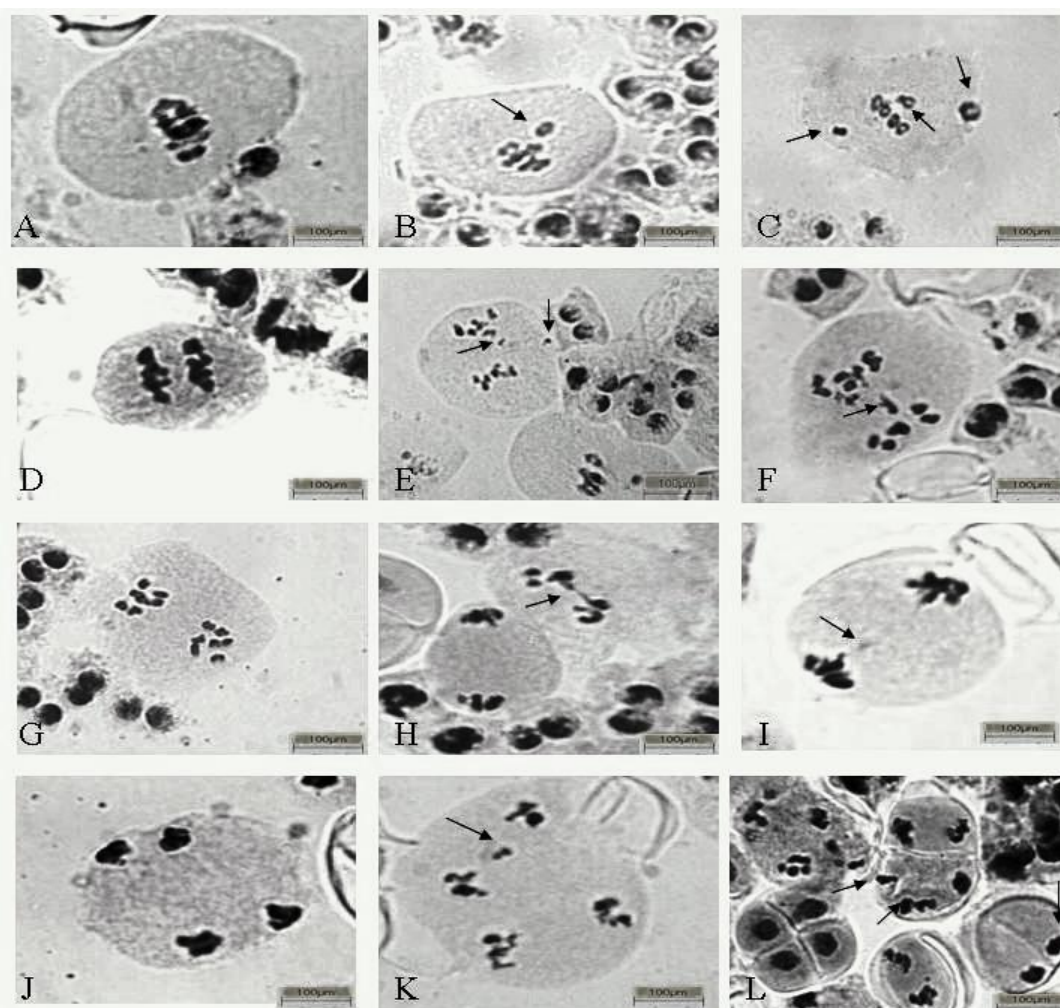
| Genotip    | Variantă        | CMP analizate (nr.) | CMP normale (nr.) | Tipuri aberații |           |       |           | Total aberații per celule anormale |
|------------|-----------------|---------------------|-------------------|-----------------|-----------|-------|-----------|------------------------------------|
|            |                 |                     |                   | Retardări       | Eliminări | Punți | Fragmente |                                    |
| s. Nistru  | Martor          | 598                 | 561               | 15              | 24        | -     | -         | 1,05±0,02                          |
|            | Descendenți VAT | 685                 | 627               | 25              | 46        | 2     | -         | 1,26±0,03**                        |
|            | Descendenți VXC | 720                 | 668               | 17              | 42        | -     | -         | 1,13±0,02*                         |
| s. Prizior | Martor          | 648                 | 616               | 15              | 18        | -     | -         | 1,03±0,01                          |
|            | Descendenți VAT | 598                 | 567               | 18              | 32        | 3     | -         | 1,89±0,07***                       |
|            | Descendenți VXC | 612                 | 574               | 22              | 38        | -     | -         | 1,32±0,02**                        |
| s. Fachel  | Martor          | 634                 | 598               | 15              | 25        | -     | -         | 1,11±0,01                          |
|            | Descendenți VAT | 588                 | 551               | 25              | 38        | 4     | 1         | 1,81±0,05***                       |
|            | Descendenți VXC | 620                 | 584               | 18              | 36        | -     | -         | 1,50±0,04***                       |

\*, \*\*, \*\*\* - diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,05$ ; 0,01; 0,001, respectiv.

La descendenții plantelor virozate cu un procent proxim martorului au fost identificate eliminări și cromozomi retardatari, precum și într-un număr redus punți cromatidice cu sau fără fragmente. Fragmentările și perturbările meiozei sunt considerate drept consecințe ale restructurărilor genelor sau a stărilor de dezechilibru [63]. De asemenea, este sugerat, că aberațiile cromozomale pot apărea ca urmare a devierilor *crossing-over*-ului.



**Anomalii meiotice la plantele de orz infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului și descendenții acestora.** Răspunsurile soiurilor de orz analizate la infectarea cu VMDO, stabilite prin relații compatibile și viroză sistemică, au produs semnale specifice, inclusiv în țesuturile îndepărtate, neinfectate, precum microsporiile. Infecția virală a condiționat majorarea numărului CMP cu aberații de 2,5 - 2,9 ori în prima diviziune și de 2,3 – 2,6 ori în diviziunea II. Spectrul aberațiilor atestate a inclus cromozomi retardatari, eliminări de cromozomi sau cromozomi precoci, punți cromozomale sau cromatidice (Figura 4.4).



**Fig. 4.4. Diviziuni meiotice la orz la diferite etape: A) metafază I normală; B) metafază I cu o eliminare de cromozomi; C) metafază I cu cromozomi precoci; D) anafază I normală; E) anafază I cu cromozomi precoci și retardatari; F) telofază I cu cromozomi retardatari; G) telofază I normală; H) și I) telofază I cu punți cromozomale; J) telofaza II normală; K) telofaza II cu retardări; L) segregarea neechivalentă a cromozomilor (x 600).**

Cel mai frecvent au fost identificați cromozomii retardatari sau precoci, stabiliți cu o rată semnificativ mai majoră comparativ cu martorul [17]. Perturbările conjugării cromozomilor omologi au favorizat clivarea anormală a cromozomilor, ceea ce a condus în etapele ulterioare la retardarea sau eliminarea precoce a cromozomilor. Destabilizarea segregării se consideră a fi rezultatul desinapsiei și formării de univalenți, dar și a dereglărilor aparatului mitotic, responsabil de distribuția echivalentă a materialului genetic între celulele fiice [81].

**Anomalii meiotice la descendenții plantelor de orz infectate.** Investigațiile citologice ale descendenților de orz obținuți de la plantele infectate cu VMDO au demonstrat că procesele de meioză la etapele de anafază-telofază I și II au decurs în mare parte regulat. Cota celulelor cu diferite aberații a variat la genotipurile martor între 10-11% și 11,4-12,2% în variantele experimentale. Cu toate că rata CMP cu aberații a deținut valori similare martorului, în variantele experimentale a fost înregistrată sporirea frecvenței aberațiilor meiotice per celulă polinică, iar în baza analizei varianței a fost scos în evidență impactul infecției virale în destabilizarea proceselor nu doar în anafaza-telofaza I, dar și asupra proceselor de segregare a materialului genetic în cea de-a doua diviziune meiotică (Tabelul 4.8).

**Tabelul 4.8. Analiza varianței frecvenței anomaliilor meiotice la descendenții de orz obținuți de la plante infectate**

| Sursă de variație | Grad de libertate | Suma pătratelor | S <sup>2</sup> | Testul F | P      |
|-------------------|-------------------|-----------------|----------------|----------|--------|
| <b>A-T I</b>      |                   |                 |                |          |        |
| A: Genotip        | 2                 | 12,8544         | 12,8544        | 0,05     | 0,7158 |
| B: Virus          | 1                 | 3260,01         | 1630,01        | 8,24     | 0,0008 |
| Interacțiunea AB  | 2                 | 248, 644        | 124,322        | 0,72     | 0,5422 |
| Total             | 35                | 12146,66        |                |          |        |
| <b>A – T II</b>   |                   |                 |                |          |        |
| A: Genotip        | 2                 | 164,735         | 164,735        | 1,57     | 0,3856 |
| B: Virus          | 1                 | 2628,58         | 1314,29        | 9,24     | 0,0007 |
| Interacțiunea AB  | 2                 | 31,428          | 14,832         | 0,21     | 0,7351 |
| Total             | 35                | 5238,86         |                |          |        |

Datele obținute, indică cert, că formarea meiocitelor normale cu un set echilibrat de cromozomi este influențată de infecția produsă de VMDO, care a condus la destabilizări menținute și la descendenții sănătoși ai plantelor infectate. Efecte genetice produse de infecția virală sunt raportate de Dong X. [33] la plantele de tutun infectate cu VMT, remarcând o creștere a rearanjamentelor ADN-ului la descendenții plantelor infectate și indicând faptul că recombinația indusă de patogen poate duce la adaptări ereditare la stres.

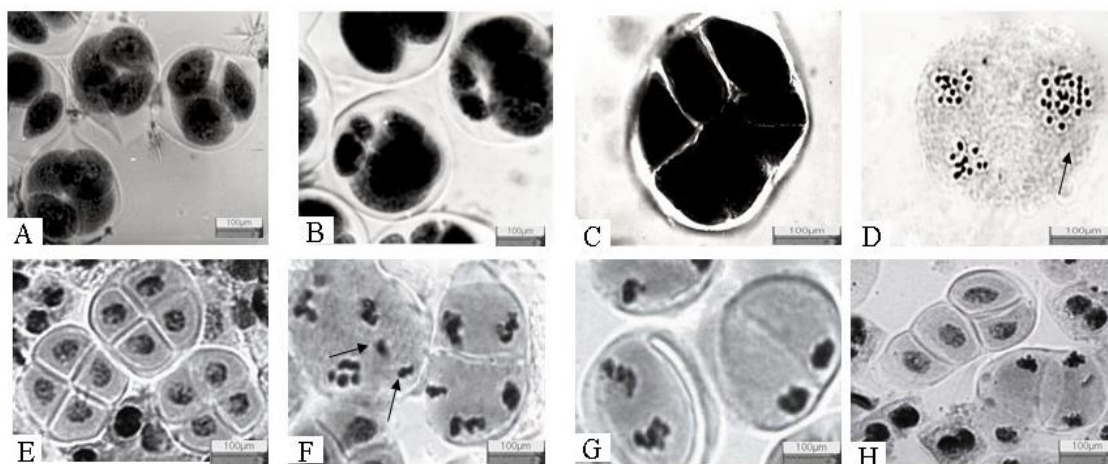
#### **4.4. Regularitatea diviziunilor meiotice la tomate și orz în condiții de patogenză virală**

Fiecare microspor poate fi privit ca o unitate morfo-funcțională independentă, ce reflectă cu precizie programul de dezvoltare al gametofitului și expresia relațiilor cu țesuturile/ organul constituent, precum și mediul înconjurător. Formarea și dezvoltarea microsporocitelor sunt asigurate de țesuturile anterei, prioritar de stratul tapetal, dar și de fluxul de nutrienți transportați de la celelalte organe ale plantei, iar deplina activitate funcțională a meiocitului este determinată de starea generală a plantei.

**Aspectul morfologic al tetradelor în anterele plantelor de tomate și orz infectate cu virusuri.** Printre metodele citogenetice, evaluarea microsporogenezei în baza analizei tetradelor constituie una clasică și uzuală în soluționarea diverselor probleme ale biologiei aplicate. Tetradele prezintă un model de perspectivă în studierea mutațiilor meiotice

ce, regularității diviziunilor celulare, reprezentând expresia morfologică primară a anomaliilor meiotice produse [40], aplicate în aprecierea genotoxicității pentru variate substanțe chimice și factori poluanți (pesticide, metale grele, radionuclizi etc.) [65].

La etapa de tetrade, în sistemele analizate au fost relevate diferențe apreciabile ale microsporogenezei la plantele de tomate și orz sănătoase comparativ cu cele infectate cu virusuri. Infecția virală la tomate a favorizat formarea poliadelor (în special pentade) și diadelor; mai puțin a monadelor. Diferențe semnificative s-au observat în nivelul ratei triadelor (uniforme și neuniforme). La orz, comparativ cu tomatele, a fost atestat un procent mai sporit al monadelor și diadelor. Specific pentru tomate este formarea simultană a microsporilor și distribuirea lor tetraedrică, iar pentru orz – succesivă cu repartizare izobilaterală (Figura 4.5).



**Fig. 4.5. Aspectul morfologic al tetradelor la tomate și orz:** A) tetrade normale la s. Fachel; B) tetrade cu microspori neechivalenți la s. Fachel infectat cu VAT; C) poliadă; D) telofaza II cu distribuții neechivalente de cromozomi; E) tetrade normale la orz, s. Galactic; F) telofaza II cu micronuclee și distribuții neechivalente de cromozomi la orz s. Galactic infectat cu VMDO (indicate cu săgeți); G) diade anormale la orz, s. Galactic infectat cu VMDO; H) tetradă de tipul T (x 400).

Ca rezultat anormal al microsporogenezei, la plantele de orz infectate cu VMDO a fost atestată și prezența tetradelor de tip T (Figura 4.5 H). Se consideră, că modul diferit de distribuire a microsporilor în tetrade este consecința orientării diferite a firelor fusului acromatic și a fragmoplastului. Astfel, putem conchide că generarea sporadelor anormale reflectă impactul infecțiilor virale asupra proceselor de segregare a cromozomilor, formării și orientării elementelor fusului de diviziune, precum și a procesului de citochineză. Anomaliile descrise survin ca rezultat al patogenezei virale prin modificări ale țesuturilor trofice ale anterei, inductoare de efecte recombinogene, restructurări ale cromozomilor și polen anormal.

**Influența infecției virale asupra derulării fazelor meiotice la tomate și orz.** Conform datelor din literatură, meioza la tomate decurge asincron, astfel încât în cadrul aceleiași antere se conțin CMP la diferite etape ale diviziunii. Diferențe în derularea fazelor se atestă, de asemenea, între vârful și baza anterei, ceea ce este determinat de asigurarea graduală a celulelor microsporale cu nutrienți pe lungimea anterei [40]. Ținând cont de această diferență pentru studiile citologice a fost utilizată doar partea de mijloc a anterelor.



În corespundere cu datele evaluărilor citologice, s-a stabilit că infecțiile virale produc o accentuare a asincronismului [15]. Astfel, dacă în anterele plantelor sănătoase prevalau CMP în profaza I, în anterele cu lungime proximă ale plantelor infectate cu virusuri predominau microsporii la diferite etape, tetradele fiind majoritare. Eterogenitatea microsporilor în cadrul aceluiași microsporangiu se consideră a fi consecința asincronismului proceselor meiotice [38].

Sporirea eterogenității, dar și modificarea relației dintre lungimea anterei/fază meiotică au fost remarcate pentru toate sistemele virus-patogen analizate. Mai mult ca atât, destabilizarea fazelor meiotice la plantele de tomate infectate este însoțită de o accelerare a întregului proces de diviziune. Sincronizarea diviziunilor celulare este sub control genetic [54], iar periodicitatea poate fi influențată de multiple procese, care se stabilesc de la primele etape. Conform unor opinii asincronismul conduce la formarea polenului steril [46] sau la gameți cu număr de cromozomi neechilibrat [39] și este considerat o anomalie meiotică [76].

## **5. EVALUĂRI CITOGENETICE ALE PATOGENEZEI VIRALE LA PLANTELE INFECTATE ȘI LA DESCENDENȚII ACESTORA**

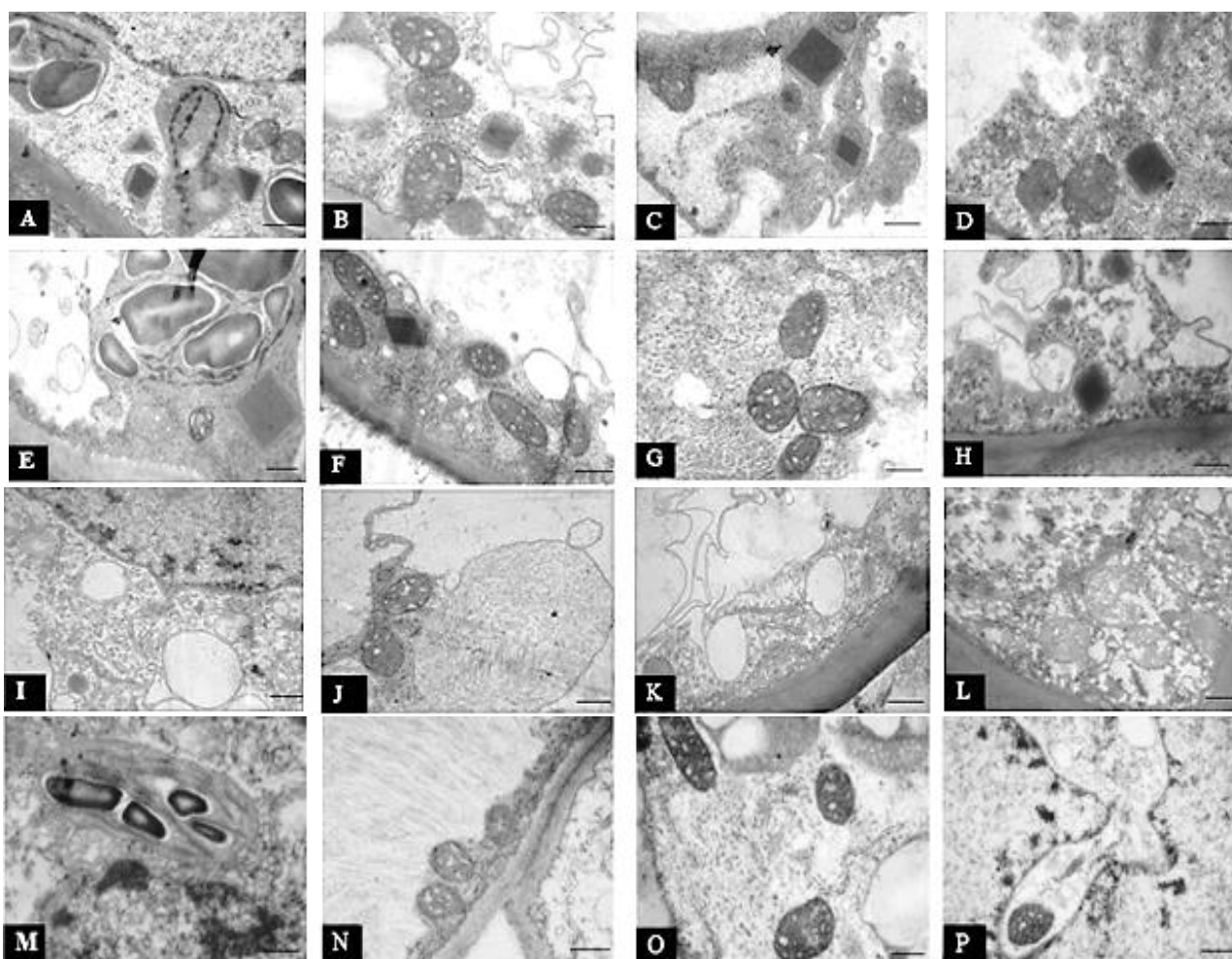
### **5.1. Reacții defensive specifice și nespecifice ale tomatelor infectate cu virusuri și a descendenților acestora**

Infecțiile compatibile sau incompatibile generează diverse molecule de semnalizare, inclusiv specii reactive de oxigen (SRO). În calitate de surse de SRO pot servi membranele plasmatică, apoplastul, reticulul endoplasmatic, citosolul, precum și matricea extracelulară, însă mitocondriile, cloroplastele și peroxizomi sunt considerate cele mai importante organite implicate în generarea SRO [66]. În contextul celor relatate, a prezentat interes aprecierea aspectelor ultrastructurale complementar studiului activității enzimelor asociate stresului biotic în sisteme gazdă-patogen cu diferită reacție la infecțiile virale. În acest scop în cercetare au fost incluse soiurile de tomate Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) și Craigella (Tm-1/Tm-1), deținătoare de gene de rezistență la VMT, specia *S. pimpinellifolium*, ce a exprimat toleranță, și s. Elvira susceptibil la infectare cu virusurile VMT sau VAT.

În cazul soiurilor cu gene de rezistență la infectarea cu VMT structura internă și organizarea ultrastructurală nu au suportat modificări apreciable: plastidele și mitocondriile au fost normal dezvoltate și au prezentat aspecte tipice matorului. În schimb a fost relevat un număr sporit de peroxizomi (Figura 5.1 B, F). Tendințe similare au fost puse în evidență în mezofilul soiurilor Craigella (Tm-1/Tm-1) și Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) infectate cu VAT.

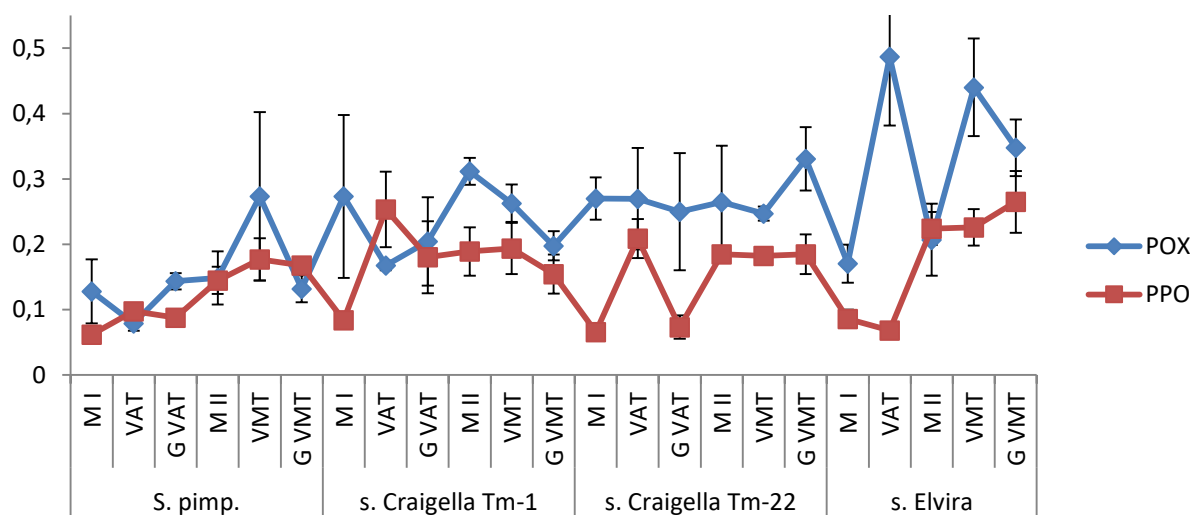
Aceste sisteme s-au evidențiat la nivel subcelular prin prezența unui număr major al mitocondriilor, peroxizomilor, ce se consideră o reacție de apărare la factori de diferită natură cuplați cu procesele de detoxifiere. Menținerea integrității structurale a fost descrisă în celulele mezofilului speciei *S. pimpinellifolium*, infectate cu VMT sau VAT (Figura 5.1 N, O). Aparatul nuclear a prezentat aspect eucromatic, precum și invaginări semnificative ale membranei nucleare ce denotă activarea traficului nucleocitoplasmatic. În celulele s. Elvira caracterizat prin susceptibilitate față de VMT și

VAT, s-a atestat accentuarea gradului de reorganizare a structurii interne: vacuolizarea reticulului endoplasmatic, reducerea cristelor și distrucția matricei mitocondriale (Figura 5.1 J-L). În sistemele gazdă-patogen analizate s-a stabilit, că reorganizările intracelulare corelează cu gradul de manifestare a simptomelor bolii.



**Fig. 5.1. Expresii ultrastructurale ale organelor celulelor mezofilului la infectarea cu virusuri a genotipurilor de tomate cu diferită reactivitate: s. Craigella (Tm-1/Tm-1) (A-D); s. Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) (E-H), s. Elvira (I-L), *S. pimpinellifolium* (M-P) în variantele martor (A, E, I, M) și a plantor infectate cu VMT (B, F, J, N) și VAT (C, D, G, H, K, L, O, P) (scara barei 0,8  $\mu$ m).**

În condiții normale, SRO produse la nivel intracelular sunt eficient metabolizate, iar acest echilibru între producerea și detoxifierea SRO este susținut de factori antioxidanți enzimatici și nonenzimatici [29; 55; 66]. Ținând cont de particularitățile procesului de patogeneză, pentru evaluarea activității peroxidazei (POX) și polifenoloxidazei (PPO), enzime majore antrenate în reacțiile de detoxifiere și apărare, mostrele au fost colectate la începutul etapei de exteriorizare a simptomelor virale, ceea ce a condiționat existența a doi martori: I pentru plantele infectate cu VAT și II pentru cele infectate cu VMT. În sistemele patologice analizate activitatea acestor doi fermenți a prezentat dependență de sistemul genotip-patogen (Figura 5.2).



**Fig. 5.2. Activitatea peroxidazei și polifenoloxidazei în extractele vegetale ale genotipurilor plantelor infectate cu virusuri și descendenții lor.** Notă: axa ordonatelor – unități ale densității optice; axa absciselor – variantele experimentale: M – martor, G – descendenți.

La plantele s. Elvira infectate cu VAT sau VMT s-a constatat o creștere semnificativă a activității peroxidazei. Infecția cauzată de VMT a condus la un nivel mai ridicat al POX la *S. pimpinellifolium*, în timp ce la descendenți valoarea a fost la nivelul martorului.

Abateri majore ale activității PPO au fost remarcate numai la genotipurile infectate cu VAT, agent patogen cu un grad de patogenitate mai accentuat. Cea mai înaltă creștere, de cca 3 ori s-a constatat la genotipurile Craigella (Tm-1/Tm-1) și Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>). Sporirea activității PPO a înregistrat, de asemenea, valori semnificative la plantele de *S. pimpinellifolium* infectate cu VAT, precum și la descendenți. Creșterea valorii medii a PPO a fost înregistrată la genotipurile ce au prezentat un complex de reacții defensive (menținerea integrității structurale, sporirea numărului de mitocondrii, peroxizomi, accentuarea proceselor litice prin dezvoltarea diverselor tipuri de lizozomi), iar diminuarea a fost atestată în cazul genotipului care a manifestat simptome severe, de ex. s. Elvira infectat cu VAT. Astfel, în condiții de patogeneză virală, creșterea activității PPO a fost stabilită la gazdele tolerante sau cu gene de rezistență, iar a POX – în sistemele genotip-virus care au expus schimbări patologice mai profunde.

În crearea răspunsurilor defensive, un rol important revine factorilor non-enzimatici, cum ar fi metaboliții secundari cu rol antioxidant, precum compușii fenolici, steroidali. În acest scop, a prezentat interes evaluarea histologică a localizării  $\alpha$ -tomatinei, un alkaloid implicat în formarea răspunsului plantelor la stresul biotic, inclusiv virusuri [73]. Conform studiului histologic al secțiunilor pețiolilor s. Elvira, speciei *S. pimpinellifolium*, soiurilor Craigella (Tm-1/Tm-1) și Craigella (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>) infectate cu VMT sau VAT, au fost certificate deosebiri în localizarea și gradul de acumulare a granulelor de  $\alpha$ -tomatină (Figura 5.3).

Acumulări semnificative de alcaloid au fost identificate în celulele parenchimale ale sp. *S. pimpinellifolium* infectate cu VAT sau VMT (Figura 5.2. B, C), ale soiurilor deținătoare de gene de rezistență în condiții de patogeneză virală (Figura 5.2. I-J, L-M). Date similare se constată și pentru alte sisteme gazdă-patogen [73], gradul de înmagazinare a  $\alpha$ -tomatinei corelând cu nivelul de rezistență.

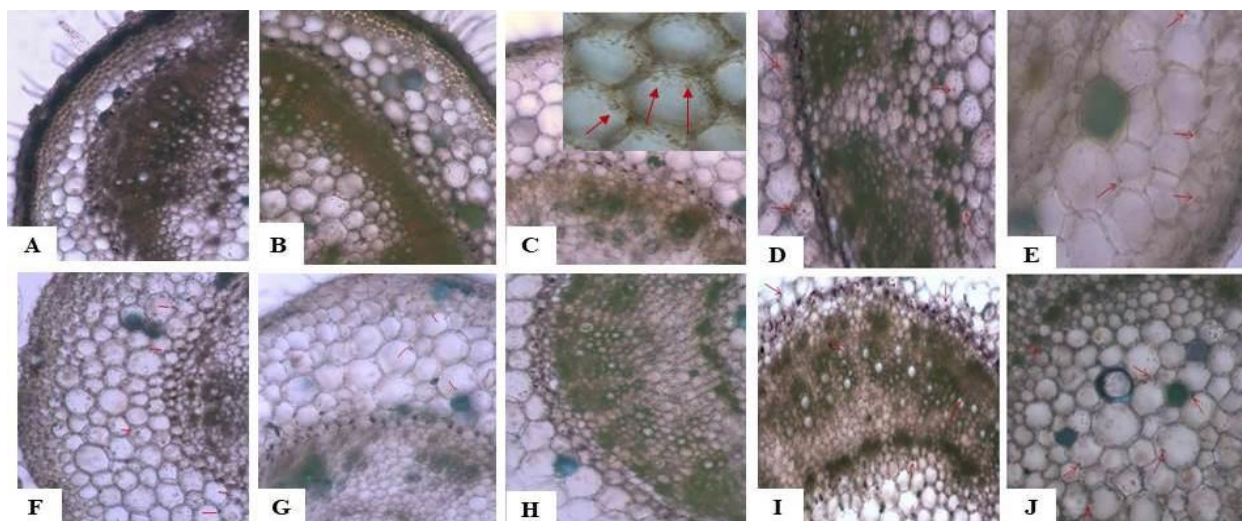


Fig. 5.3. Localizarea histochimică a  $\alpha$ -tomatinei în țesuturile petiolilor plantelor de tomate sănătoase (A, F) și infectate cu VAT (B, D, G, I) și VMT (C, E, H, J) la genotipurile: A-C – *S. pimpinellifolium*; D, E – s. *Craigella* (Tm-1/Tm-1); F-H – s. *Elvira*; I, J – s. *Craigella* (Tm-2<sup>2</sup>/Tm-2<sup>2</sup>).

## 5.2. Efectul mitogen și aneugen indus de virusul dungat al orzului la plantele gazdă

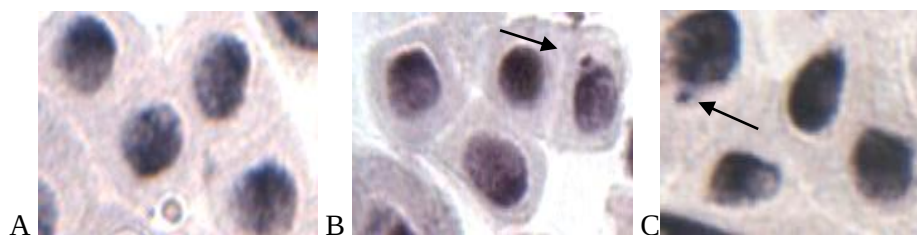
Conservatismul proceselor proliferative asigură posibilitatea utilizării diferiților parametri ai diviziunilor mitotice în studiile de monitoring. În acest scop cu succes se aplică indicele mitotic și frecvența micronucleilor [62], ce reflectă reacția genotipului la acțiunea factorilor de stres, care reprezintă mecanismul de adaptare a organismului exprimat la nivel celular, orientat spre menținerea homeostaziei în sistemele celulare.

Conform rezultatelor studiului citologic, valoarea indicelui mitotic în variantele martor la soiurile de orz analizate a fost cuprinsă între 10,4-12,7%. Materialul semincer obținut de la plante infectate cu virus și/sau iradiate a prezentat valori sub media estimată. O reducere mai înaltă a valorii indicelui mitotic a fost constatată pentru loturile cu aplicare asociată a VMDO și razelor gama în doza de 250 Gy. O scădere similară a fost remarcată și în varianta cu utilizare doar a razelor gama în aceeași doză (250 Gy). Impactul separat cauzat de infecția virală a fost mai accentuat decât efectul razelor gama în doza de 100 Gy, precum și 150 Gy (diferențe între variantele experimentale statistic confirmate pentru  $P \leq 0,05$ ).

Este cunoscut, că fluctuațiile indicelui mitotic reflectă direct intensitatea reacțiilor metabolice, iar ritmul modificării este dependent de viteza reacțiilor fermentative [78]. Diminuarea valorii indicelui mitotic sub acțiunea diferiților factori denotă caracterul mitodepresiv al acestora, generat de reprimarea diviziunilor celulare [70]. Reducerea valorilor indicelui mitotic în variantele experimentale a fost complementată de creșterea frecvenței micronucleilor, formațiuni cromatinice extranucleare rezultate în urma rupturilor cromozomale sau a aneuploidiei [62], considerate indici relevanți ai instabilității genomului [79].

În baza examinării preparatelor citologice obținute prin tehnica de colorare cu carmină acetică, micronucleii se disting ca structuri cromatinice adiacente nucleelor, mărimea cărora poate varia mult (Figura 5.4).





**Fig. 5.4. Celule interfazice în meristemele radiculare de orz: A) interfaze normale în varianta martor; B) interfază cu micronucleu (indicat prin săgeată) în rădăcioarele plantelor de orz, s. Galactic infectat cu VMDO; C) micronucleu (indicat prin săgeată) în celulele meristemei radiculare la s. Galactic iradiat cu raze gama 150 Gy și infectat cu VMDO (x 400).**

Este important de menționat, că la toate cele trei soiuri de orz analizate, infecția virală a indus formarea unui număr de micronuclei mai mare decât în asociere cu razele gama în doza de 100 Gy. În cazul loturilor cu aplicare a razelor gama în doza de 150 Gy, rata micronucleilor a fost aproximativ la același nivel ca și în cazul acțiunii radiației în complex cu infecția virală. Razele gama în doza de 250 Gy a indus creșterea frecvenței micronucleilor comparativ cu martorul de cca 5 ori la s. Galactic, 6,7 – s. Sonor și 4,3 – s. Unirea. Rata micronucleilor la plantele virozate și derivate din semințe iradiate cu doza 250 Gy a fost, practic, la nivelul cauzat doar de radiație [5]. Complementar acestor constatări, în variantele plantelor infectate cu VMDO s-au stabilit C-metafaze. Asemenea anomalii reprezintă un rezultat al restructurărilor fusului de diviziune [35]. În lipsa citochinezei acestea conduc la formarea celulelor poliploide sau bi(poli)nucleate, iar în cazul formării fragmoplastului și a peretelui celular, pot apărea celule cu număr diferit de cromozomi. C-metafazele au fost atestate la s. Galactic și s. Sonor în loturile cu aplicare complexă a infecției virale și razelor gama 150 Gy sau 250 Gy, iar la s. Unirea – virus+250 Gy.

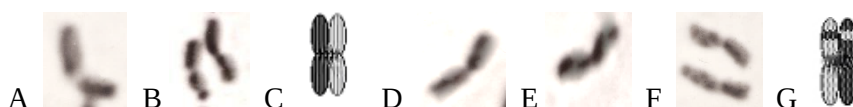
Datele examenului citogenetic al diviziunilor mitotice privitor la inducerea de degradări ale ADN-ului au fost confirmate prin estimarea mutațiilor clorofilene de tipul *albino*. De menționat, că plantule albinoase nu au fost constatate în toate variantele experimentale. Mutațiile exprimate prin lipsa pigmentilor clorofilieni au fost stabilite la s. Unirea în lotul derivat din plante infectate cu virus, separat sau în complex cu raze gama în doza de 150 Gy.

În rezultatul studiului realizat, putem concluziona că consecințele provocate de VMDO sunt similare razelor gama, care după pondere sunt mai apropiate de dozele 150 Gy sau 250 Gy, în dependență de sensibilitatea genotipului studiat. Îmbinarea ambilor factori a cauzat repercusiuni cu efect neliniar, determinate de interacțiunea factorilor genotip-virus-radiație (doza radiației). Pentru infecția virală, de asemenea, a fost constatată implicarea în inducerea de anomalii ce au la bază dereglări ale formării și funcționării fusului de diviziune, așa cum ar fi C-mitozele – dovadă a caracterului aneugen al agentului patogen studiat.

### **5.3. Efectul clastogen cauzat de virusul mozaicului dungat al orzului la plantele gazdă**

Grație conservatismului proceselor ce stau la baza formării schimburilor între cromatidele surori (SCS), testul dat este utilizat pe larg în estimarea genotoxicității [62], fiind aplicat în evaluarea efectului mutagen al diferiților compuși atât la plante [71; 77], cât și la animale [25].

Numărul și poziția schimburilor cromatidice per cromozom au fost apreciate conform colorației diferențiate (Figura 5.5).



**Fig. 5.5. Cromozomi metafazici la *H. vulgare*: A), B) cromozomi fără schimburi cromatidice, C) reprezentare schematică a unui cromozom metafazic fără schimburi cromatidice; D) cromozom cu un schimb cromatidic în brațul lung; E) cromozom cu câte un schimb cromatidic în ambele brațe; F) cromozomi cu multiple schimburi cromatidice; G) reprezentare schematică a unui cromozom metafazic cu un schimb cromatidic (x 2000).**

În baza aplicării testului SCS a fost constatat, că în condiții normale în medie se produc 5,6 – 6,1 schimburi cromatidice surori per celulă. Atât radiația, cât și infecția virală au cauzat creșterea frecvenței SCS (Tabelul 5.1).

**Tabelul 5.1. Frecvența schimburilor între cromatidele surori induse de virusul mozaicului dungat al orzului în celulele meristemelor radiculare la plantele de orz (per celulă)**

| Variantă      | Genotip         |                |                |
|---------------|-----------------|----------------|----------------|
|               | s. Sonor        | s. Unirea      | s. Galactic    |
| Martor        | 6,128±0,337     | 5,561±0,259    | 6,108±0,265    |
| Virus         | 8,359±0,299***  | 8,641±0,286*** | 8,703±0,312*** |
| 100Gy         | 8,585±0,273***  | 7,410±0,284*** | 6,611±0,240*   |
| 100Gy + virus | 8,946±0,287***  | 7,973±0,314*** | 8,028±0,244*** |
| 150Gy         | 8,846±0,295***  | 7,270±0,339*** | 7,973±0,269*** |
| 150Gy + virus | 8,385±0,281***  | 8,081±0,246*** | 9,054±0,274*** |
| 250Gy         | 10,081±0,318*** | 9,540±0,358*** | 8,081±0,291*** |
| 250Gy + virus | 10,971±0,305*** | 8,811±0,321*** | 8,838±0,306*** |

\*, \*\*\* - diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,05$ ; 0,001

În cazul infecției virale, cel mai înalt procent de inducere a SCS a fost constatat la s. Unirea (o creștere cu cca 55,4% față de martor,  $P \leq 0,001$ ). Efectul indus de către razele gama a variat în funcție de doză aplicată la tratarea semințelor, precum și genotipul analizat. Astfel, rata SCS în cazul radiației în doză de 100 Gy a crescut cu 40,1 % și 33,2 % față de martor, respectiv, la s. Sonor și s. Unirea, în timp ce frecvența SCS la s. Galactic a crescut doar cu 8,23% ( $P \leq 0,05$ ). Razele gama în doză de 150 Gy au indus un efect mai depresiv, decât cel cauzat de doză 100 Gy, doar la s. Galactic. La s. Unirea rata SCS per celulă a variat în jur de 7,2, având tendință de micșorare. Puterea de modificare a ratei SCS în cazul infecției virale aplicate în complex cu razele gama a variat în dependență de genotip și doză razelor gama.

Luând în considerare spectrul schimburilor între cromatidele surori, a fost constatat, că numărul și tipul SCS sunt influențate de către ambii factorii analizați: infecția virală și radiația gama [4]. Dacă la plantele martor în medie se produc 0,40-0,46 SCS per cromozom, atunci în unele variante experimentale numărul lor a atins valoarea 0,69 – 0,73 (la soiurile Galactic și Sonor iradiat cu raze gama în doză de 250 Gy).

Studiul distribuției SCS a scos în evidență majorarea ratei cromozomilor cu trei și mai multe schimburi, îndeosebi la variantele cu utilizare a infecției virale separat sau

în asociere cu razele gama. Sporirea frecvenței medii a SCS în cazul infecției virale, precum și a radiației se produce preponderent pe contul schimburilor multiple, rata că- rora în condiții normale este redusă (0,28-0,48 per celulă). În variantele experimentale, procentul SCS a crescut esențial atingând valoarea maximală la s. Sonor cu aplicare mixtă a VMDO și razelor gama în doza de 250 Gy. Pentru varianta dată a fost consta- tată o creștere a cotei cromozomilor cu schimburi multiple de 12,7 ori mai mare față de martor. Majorarea SCS în condițiile patogenezei virale indică asupra efectului ge- notoxic cauzat de VMDO, exprimat prin majoritatea schimburilor multiple.

#### **5.4. Expresia unor gene asociate stresului la orz și descendenții obținuți de la plante infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului**

**Activitatea transcripțională a unor gene asociate metabolismului antioxidant.** Prin tehnică RT-PCR a fost evaluată expresia unor gene implicate în procesele antioxi- dante (APX și SOD) și celor ce determină proteinele asociate cu patogeneza (PR-3, PR-5; PR-10) în plantulele de orz sănătoase și crescute din semințe formate în condiții de pato- geneză virală cauzată de VMDO [19]. Conform rezultatelor obținute activitatea genelor APX și SOD la plantele virozate a fost diminuată față de martor (Tabelul 5.2).

Nivelul de variabilitate a purtat caracter specific genotipului. Cea mai semnifica- tivă reducere a activității transcripționale a genei APX a fost înregistrată la s. Galactic (o reducere cu 83,7%), în timp ce la s. Sonor variațiile nu au avut suport statistic. Po- trivit lui Clarke S.și coaut. [29], activitatea enzimelor sistemului antioxidant pentru combinațiile virus-plantă este influențată de tipul reacției gazdei.

**Tabelul 5.2. Activitatea transcripțională (u. c) a unor gene a metabolismului antioxidant și defensiv în frunzulițele plantelor de orz sănătoase și infectate cu VMDO**

| Genă         | Genotip         | Martor        | Virus          |
|--------------|-----------------|---------------|----------------|
| <b>SOD</b>   | <b>Sonor</b>    | 0,5175±0,0443 | 0,3543±0,0387* |
|              | <b>Galactic</b> | 0,7675±0,0719 | 0,6317±0,0760* |
|              | <b>Unirea</b>   | 0,5772±0,0339 | 0,4643±0,0420* |
| <b>APX</b>   | <b>Sonor</b>    | 0,3183±0,0379 | 0,3327±0,0549  |
|              | <b>Galactic</b> | 1,8255±0,4343 | 0,9937±0,1761* |
|              | <b>Unirea</b>   | 0,8307±0,0856 | 0,5433±0,0250* |
| <b>PR-3</b>  | <b>Sonor</b>    | 0,0947±0,0091 | 0,0065±0,0012* |
|              | <b>Galactic</b> | 0,7102±0,0624 | 0,1712±0,0137* |
|              | <b>Unirea</b>   | 0,0297±0,0046 | 0,0333±0,0065* |
| <b>PR-5</b>  | <b>Sonor</b>    | 0,1970±0,0219 | 0,5130±0,0053* |
|              | <b>Galactic</b> | 0,1638±0,0236 | 0,7525±0,0665* |
|              | <b>Unirea</b>   | 0,1065±0,0133 | 0,3043±0,0286* |
| <b>PR-10</b> | <b>Sonor</b>    | 0,0142±0,0017 | 0,0025±0,0005* |
|              | <b>Galactic</b> | 0,0446±0,0044 | 0,0155±0,0016* |
|              | <b>Unirea</b>   | 0,0173±0,0029 | 0,0202±0,0035* |

\* - diferențe semnificative față de martor pentru  $P \leq 0,05$ .

La soiurile analizate concentrația transcripțiilor genelor PR a fost semnificativ modi- ficată. Rezultatele prezentului studiu denotă o stimulare sau inhibare a genelor PR-3 și PR-10 în dependență de genotip, în timp ce pentru gena PR-5 a fost stabilită sporirea acti- vității în toate variantele experimentale. Activitatea transcripțională a genei PR-3 a scăzut pentru variantele infectate a s. Galactic și s. Sonor (de 4,2 și 14,6 ori, respectiv), în timp ce la s. Unirea s-a înregistrat o creștere a concentrației relative a transcripților cu 12%. Un tablou similar a fost descris și pentru gena PR-10 (Tabelul 5.2; Figura 5.6).



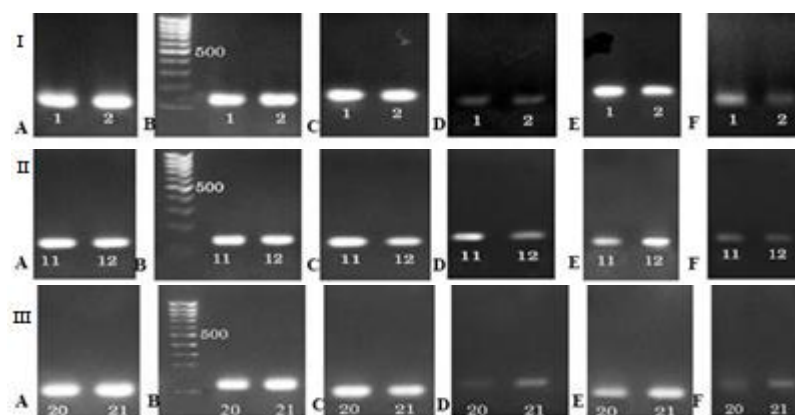
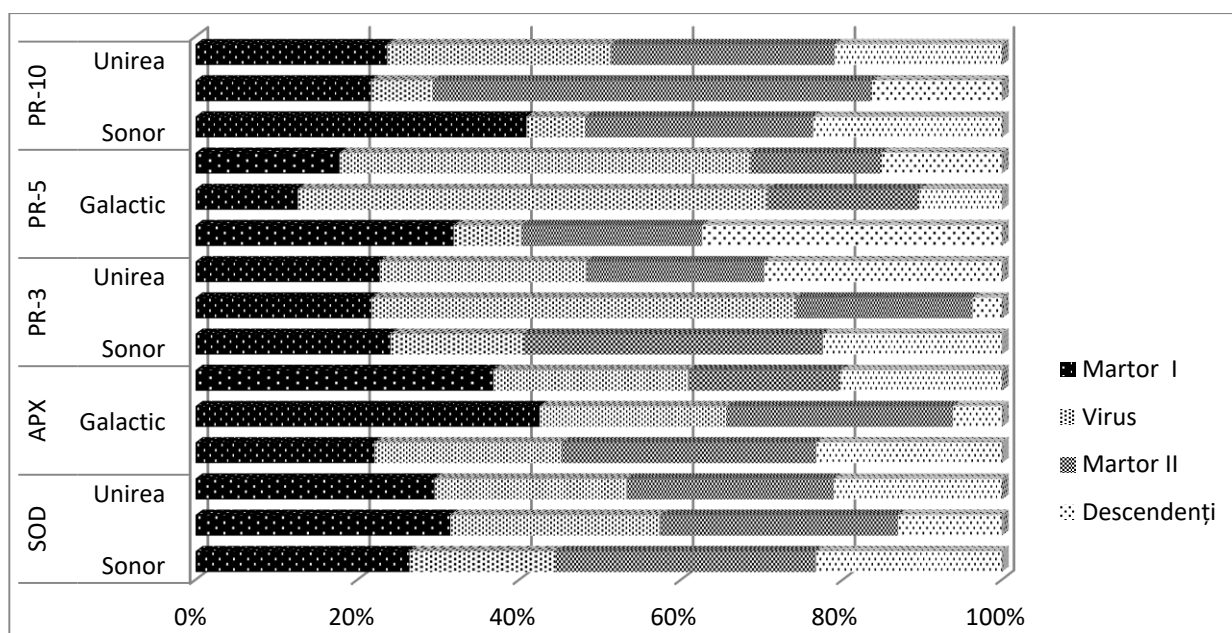


Fig. 5.6. Profilurile de amplificare a produselor primerilor pentru genele: A -  $\alpha$ -tubulina, B - SOD, C - APX, D - PR-3, E - PR-5, F - PR-10 la plantele variantei martor (1, 11, 20), infectate (2, 12, 21) a soiurilor I) Galactic, II) Sonor, III) Unirea.

Activitatea transcripțională a genei PR-10 la s. Sonor și s. Galactic infectate cu VMDO a prezentat valori de 5,7 și 2,9 ori mai reduse comparativ cu martorul. Soiul Unirea a reacționat în condiții de patogeneză virală prin sporirea activității genei PR-10 cu 16,8%. Este cunoscut, că proteinele PR-10 prezintă activitatea ribonucleazică, iar PR-3 - chitinazică și dețin o specificitate mai mare. Rolul diferitelor tipuri de proteine PR rămâne incert și discutabil. Se consideră, că proteinele PR cu activitate ribonuclează (tip PR-10) sunt implicate în protecția antivirală, în timp ce PR-3 promovează procesul infecțios [82]. Sistemele gazdă-patogen analizate de noi au expus un răspuns sistemic la infectarea cu VMDO, iar reacția diferită a fost conferită de particularitățile genotipului.

Expresia maximală a genelor legate de patogeneză a fost raportată pentru PR-5 în toate variantele de tratament. Cea mai mare creștere (de 4,6 ori) a fost detectată la s. Galactic. Totodată, acest genotip a prezentat și cea mai mare reducere a activității transcripționale a genei APX implicate în procesele de detoxifiere a peroxidului de hidrogen. Proteina PR-5 este asociată cu stresul mediat de calea de semnalizare dependentă de etilenă sau jasmonat [48], iar concentrația în condiții normale este mică. În condiții de patogeneză este relatată creșterea semnificativă a acestor proteine [74]. Fitovirusurile sunt capabile să reprogrameze expresia genelor gazdei, generând interdependențe între activitatea transcripțională și patogenitatea virusului de tipul „shut-off”, între intensitatea expresiei genelor și severitatea simptomelor virale [72].

**Expresia unor gene asociate proceselor antioxidante și de patogeneză la descendenții de orz obținuți de la plante infectate.** La descendenții plantelor infectate activitatea transcripțională a genelor asociate stresului biotic a fost modificată pentru majoritatea sistemelor analizate. La s. Sonor și s. Galactic, concentrația relativă a transcripților genelor responsabile de activitatea antioxidantă a fost semnificativ redusă comparativ cu martorul (Figura 5.7). Astfel, expresia genei SOD a fost diminuată cu 26,6 și 55,9% la s. Sonor și s. Galactic corespunzător. Aceste două genotipuri au expus, de asemenea, un nivel de subexpresie și pentru gena APX. Este important de notat, că amplitudinea modificărilor la descendenții acestor soiuri a deținut valori mai reduse comparativ cu efectul primar produs de infecția virală. Totodată, activitatea transcripțională a genelor APX și SOD la descendenții s.Unirea a prezentat un nivel proxim martorului.



**Fig. 5.7. Activitatea transcripțională (u. c.) a genelor asociate cu stresul în frunzulițele plantelor de orz sănătoase, infectate cu VMDO și descendenții acestora.**

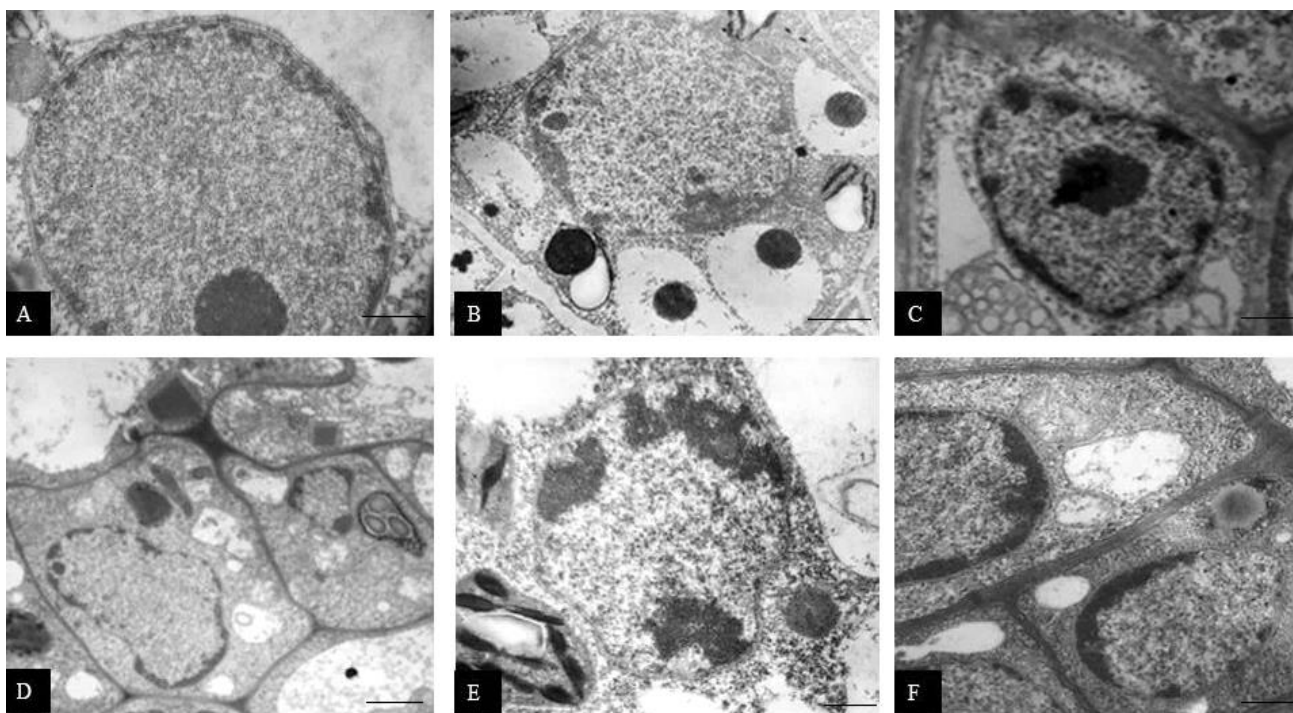
Activitatea transcripțională a genelor asociate patogenezei (PR-3, PR-5 și PR-10) la descendenții plantelor infectate a suportat fluctuații orientate în direcția sporirii sau supresiei în dependență de genotip. Reprimarea activității genei PR-3 a fost descrisă la descendenții s. Sonor și s. Galactic, în timp ce la s. Unirea concentrația transcripților PR-3 s-a majorat de 1,3 ori față martor. Infecția virală provocată de VMDO a avut repercusiuni și asupra nivelului de expresie a genelor PR-5 și PR-10. Similar plantelor infectate, la descendenții orzului infectat cele mai accentuate modificări s-au înregistrat la s. Sonor și s. Galactic pentru PR-5 cu o supraexpresie de 1,7-1,8 ori mai înaltă față de martor. În corespundere cu pattern-ul de expresie la s. Unirea infecția virală nu a produs efecte semnificative la descendenții acestui genotip. Direcția variației concentrației transcripților PR-10 la descendenții s. Galactic și s. Sonor a fost orientată spre subexpresie, iar la s. Unirea – supraexpresia genei.

Rezultatele analizei expresiei genelor metabolismului antioxidant și a proteinelor asociate patogenezei relevă orientări similare la plantele infectate și descendenții derivați din condiții patologice. Impactul primar al infecției virale a avut o variabilitate mai accentuată comparativ cu efectul transdus la descendenți. Astfel, modificările evidente în activitatea transcripțională a genelor includ: (i) suprimarea genelor implicate în metabolismul antioxidant; (ii) activarea sau subexpresia, în dependență de specificitatea genotipului, a genelor ce codifică proteine cu activitate ribonucleazică sau chitinazică; (iii) supraexpresia genelor pentru factorii asociați stresului mediat de căile de semnalizare reglate de acidul jasmonic sau etilenă, cum ar fi PR-5.

### **5.5. Efectul nucleopatic al virusului mozaicului conopidei în sisteme citopatice la nivelul structurilor calusale ale diferitelor soiuri de varză**

Impactul agenților virali asupra structurilor intracelulare se manifestă printr-o gamă largă de modificări care declanșează răspunsuri locale și sistemice prin multiple căi interconectate. Conform datelor relatate, virusul mozaicului conopidei provoacă alterări majore structurale ale organelor sistemului energetic, vacuolar, precum și ale nucleelor celu-

lelor mezofilului soiurilor de varză infectate sistemic. Calusurile derivate din diferite sisteme citopatice au prezentat diverse restructurări ale organelor celulare (Figura 5.8). În celulele maselor calusale proliferative obținute din mezofilul plantelor de varză infectate cu VMCo se atestă tendințe de menținere a integrității structurale, prezentând o citoplasmă fin granulată cu multipli ribozomi liberi, precum și mitocondrii compacte, plastide cu sistem tilacoidal slab dezvoltat, nuclee cu majorări apreciabile de cromatină perimembranară. Sporirea conglomerărilor de heterocromatină cu diferit grad de expresie a fost descrisă în nucleele calusurilor derivate de la plante infectate [16].



**Fig. 5.8. Aspectul ultrastructural al celulelor calusurilor cu capacitate proliferativă derivate din țesuturi ale mezofilului soiurilor de varză infectate cu VMCo. A – s. Haricovscaia, martor; B – s. Haricovscaia, VMCo; C – s. Iuniscaia, VMCo; D – s. Moldavanca, martor; E, F – s. Moldavanca, VMCo (scara barei 0,8  $\mu$ m).**

Aplicarea analizei morfometrice a structurilor nucleare a confirmat devierile constatate vizual în variantele experimentale. Calusurile proliferative derivate din mezofilul plantelor infectate au prezentat nuclee cu un volum mai mare cu 21,5 – 30,4% (Tabelul 5.3). Modificări semnificative au fost raportate pentru cromatina perimembranară. Volumul relativ al heterocromatinei distribuite atașat membranei nucleare a sporit cu 37,5; 45,5 și 55,9% în sistemele citopatice obținute de la s. Haricovscaia, s. Iuniscaia și s. Moldavanca, respectiv. De asemenea, raportul nucleu-citoplasmatic s-a majorat în toate sistemele experimentale.

Este cunoscut că sporirea zonelor de heterocromatină este o reflectare a diminuării proceselor de transcripție și, în ansamblu, a activității nucleului. În plantele infectate sistemic, virusurile sunt considerate elisitori antrenați în inducerea căilor defensive, inclusiv în producerea efectului de poziție nucleopatică [55]. Conform relațiilor din literatură, dezvoltarea infecției virale condiționează metilarea selectivă a diferitelor regiuni ale ADN-ului genomic, ceea ce duce la variații în activitatea lor transcripțională [24]. Aceste schimbări încep cu modificări conformaționale ale cromatinei și a

**Tabelul 5.3. Schimbările morfometrice ale structurilor nucleare în condiții *in vitro* a celulelor de varză albă infectate cu virusul mozaicului conopidei**

| Variantă               | Raportul nucleocitoplasmatic | Volumul relativ al structurilor nucleare |                          |                            |
|------------------------|------------------------------|------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
|                        |                              | Nucleu                                   | Cromatina perimembranară | Cromatina nucleoplasmatică |
| s. Haricovscaia        |                              |                                          |                          |                            |
| Martor                 | 0,261                        | 0,177±0,009                              | 0,032±0,0009             | 0,020±0,0006               |
| Coeficient de variație |                              | 35,90 %                                  | 19,09 %                  | 22,08 %                    |
| VMCo                   | 0,318**                      | 0,215±0,013*                             | 0,044±0,0002**           | 0,026±0,0019               |
| Coeficient de variație |                              | 37,52 %                                  | 33,85 %                  | 47,61 %                    |
| s. Moldavanca          |                              |                                          |                          |                            |
| Martor                 | 0,268                        | 0,185±0,105                              | 0,034±0,0007             | 0,019±0,0007               |
| Coeficient de variație |                              | 36,25 %                                  | 13,81 %                  | 21,94 %                    |
| VMCo                   | 0,334***                     | 0,235±0,013**                            | 0,053±0,0028**           | 0,028±0,0020**             |
| Coeficient de variație |                              | 37,49 %                                  | 34,63 %                  | 47,10 %                    |
| s. Iuniscaia           |                              |                                          |                          |                            |
| Martor                 | 0,252                        | 0,168±0,008                              | 0,033±0,0009             | 0,018±0,0007               |
| Coeficient de variație |                              | 33,65 %                                  | 18,01 %                  | 23,45 %                    |
| VMCo                   | 0,330***                     | 0,219±0,011*                             | 0,048±0,0028**           | 0,025±0,0019*              |
| Coeficient de variație |                              | 33,84 %                                  | 37,25 %                  | 47,82 %                    |

\*; \*\* - diferențe semnificative față de martor pentru  $P \leq 0,05$ ; 0,01, respectiv.

gradului de metilare a ADN-ului, care pot juca un rol important în transducția efectelor în următoarele generații și în generarea diversității individuale.

## 6. MANIFESTAREA CARACTERELOR CANTITATIVE ȘI CALITATIVE LA PLANTELE INFECTATE CU VIRUSURI ȘI LA DESCENDENȚII ACESTORA

Cuantificarea caracterelor cantitative permite descrierea exactă a genotipurilor și distingerea lor în baza particularităților specifice de expresie a interacțiunii *genotip x mediu* [36]. Fiecare individ este considerat în esență unic în ceea ce privește genotipul, iar efectele pe care le exprimă la condițiile ambientale sunt relevante și pot fi apreciate prin valorile medii, limitele abaterilor statistice, varianța caracterelor [22]. Recunoașterea rolului pe care îl au virusurile fitopatogene în procesul de inducere a recombinățiilor și mutațiilor sugerează importanța pe care o pot avea asupra expresiei caracterelor cantitative și calitative.

### 6.1. Variabilitatea caracterelor cantitative la tomate și descendenții plantelor supuse acțiunii infecției virale

**Evaluarea caracterelor cantitative la plantele de tomate infectate cu virusul aspermiei tomatelor și descendenții acestora.** Aspermia tomatelor se distinge printr-un impact semnificativ asupra habitusului plantelor infectate comparativ cu alți agenți virali (VMT, VXC). Aspectul general al plantelor sensibile la VAT prezintă modificări morfologice ale frunzelor, florilor și fructelor, gradul de expresie al căror este influențat de genotipul gazdei.

Evaluările fenologice comparative ale genotipurilor de tomate susceptibile la VAT au demonstrat variația caracterelor cantitative. VAT a cauzat diminuarea semnificativă a taliei plantelor la soiurile Nistru, Prizior și Fachel. Înălțimea lăstarului prin-

cipal a fost redusă cu cca 44 și 42 % la s. Fachel și s. Prizior, respectiv. La s. Nistru talia plantei practic a fost înjumătățită, atingând doar 28 cm comparativ cu 55 cm la martor. Plantele sănătoase ale soiurilor analizate dețineau 5,1÷5,7 lăstari roditori. La tomatele virozate a fost atestat un număr proxim de lăstari, iar reducerea distanței dintre noduri și diminuarea taliei plantelor au conferit un aspect compact al tufelor.

Perturbările microsporogenezei și morfofuncionale ale polenului au influențat în mod diferit gradul de legare și dezvoltare al fructelor. Progresarea procesului patologic a condus la sporirea graduală a diminuării numărului total de fructe legate. Este cunoscut, că parametrul *numărul de fructe* este determinat poligenic, prezentând o heritabilitate joasă și o influență majoră a factorilor de mediu [27]. De asemenea infecția virală a cauzat diminuarea semnificativă a *numărului de semințe per fruct*. Indicii biochimici ai fructelor la plantele de tomate sănătoase se caracterizează printr-un coeficient de variație foarte mic, media valorică a parametrului fiind reprezentativă pentru fiecare soi. Conținutul de substanțe uscate și aciditatea fructelor tomatelor infectate cu VAT au menținut o amplitudine a coeficientului de variație < 5%, ceea ce demonstrează variabilitatea joasă a acestui caracter. Este important de menționat, că variația zahărului total în fructele s. Prizior și s. Fachel a depășit 5%, dovedind impactul semnificativ al infecției virale asupra metabolismului hidraților de carbon [14].

**Expresia caracterelor cantitative la descendenții plantelor de tomate obținuți în condiții de patogeneză virală.** În contextul rezultatelor obținute privitor la efectul recombinogen și destabilizator al VAT asupra microsporogenezei, studiul nostru a avut ca obiectiv evaluarea expresiei caracterelor cantitative la descendenții plantelor infectate, precum talia plantei, numărul de lăstari roditori, numărul de inflorescențe de pe un lăstar și total per plantă, numărul de fructe legate pe o ciorchină și total per plantă, numărul de semințe per fruct, masa unui fruct. Conținutul substanțelor uscate, zahărului, precum și aciditatea totală au înregistrat valori medii proxime martorului. Totodată, pentru unele caractere cantitative a fost stabilită o extensie a distribuției valorilor medii. Parametrii: talia plantei, numărul de ciorchine roditoare per plantă, masa unui fruct al ciorchinei II, numărul de semințe al unui fruct, au înregistrat un diapazon al variației mai mare la toate cele trei soiuri analizate (Tabelul 6.1). Date similare au fost raportate și pentru descendenții plantelor infectate cu VMT, efectele fiind constatate și în generațiile 2 și 3 [20].

**Tabelul 6.1. Coeficientul de variație (%) al unor caractere cantitative la descendenții soiurilor de tomate infectate cu VAT (a. 1998)**

| Nr | Parametru                        | Genotip   |             |            |             |           |             |
|----|----------------------------------|-----------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|
|    |                                  | s. Nistru |             | s. Prizior |             | s. Fachel |             |
|    |                                  | Martor    | Descendenți | Martor     | Descendenți | Martor    | Descendenți |
| 1  | Talia plantei                    | 5,46      | 9,30        | 5,03       | 8,24        | 7,17      | 9,38        |
| 2  | Lăstari roditori                 | 20,28     | 19,81       | 19,23      | 25,74       | 18,12     | 25,24       |
| 3  | Ciorchine roditoare per plantă   | 15,88     | 31,80       | 15,17      | 31,95       | 14,89     | 32,39       |
| 4  | Fructe pe ciorchina II           | 28,21     | 30,37       | 30,46      | 35,00       | 19,69     | 52,50       |
| 5  | Masa unui fruct al ciorchinei II | 10,53     | 19,79       | 12,66      | 17,06       | 5,77      | 16,20       |
| 6  | Fructe per plantă                | 22,79     | 23,63       | 32,15      | 47,23       | 19,79     | 34,18       |
| 7  | Masa unui fruct                  | 8,08      | 9,80        | 3,14       | 11,97       | 3,09      | 3,96        |
| 8  | Semințe per fruct                | 4,36      | 10,55       | 3,12       | 11,60       | 3,66      | 18,25       |
| 9  | Substanțe uscate                 | 0,90      | 0,88        | 1,53       | 0,89        | 1,30      | 1,94        |
| 10 | Aciditatea totală                | 0,90      | 1,05        | 0,72       | 0,97        | 1,73      | 1,27        |
| 11 | Zahăr total                      | 1,34      | 1,49        | 1,47       | 2,13        | 2,55      | 3,13        |

Rezultatele obținute au stat la baza elaborării procedurii de obținere a recombinanților de tomate [6] ce are ca scop extinderea variabilității genetice în vederea obținerii și selectării formelor cu caractere noi prin aplicarea în calitate de factor recombinogen a VAT. Ca rezultat al efectului produs de infecția virală poate fi modificată interdependența dintre caracterele corelate, precum *masa fructului – numărul de semințe*. În așa mod au fost căpătate forme ale s. Fachel cu masă mare a fructului și număr redus de semințe; masă mare a fructelor primelor ciorchine și conținut sporit de substanțe uscate.

## **6.2. Variabilitatea caracterelor cantitative la orz și descendenții plantelor supuse acțiunii infecției virale**

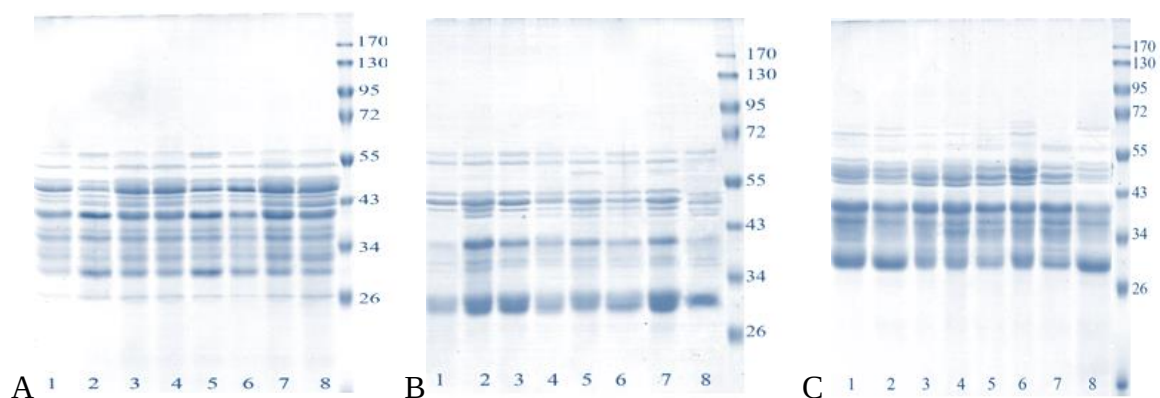
Evaluarea caracterelor cantitative asociate cu productivitatea la orz și descendenții plantelor infectate a fost obiectivul unor studii separate realizate în cadrul Laboratorului Biotehnologii vegetale, rezultatele cărora au fost expuse în lucrări științifice [11]. Conform autorilor, infectarea plantelor de orz cu VMDO a influențat mai puternic ( $P \leq 0,001$ ) variația *numărului de boabe per spic*. La s. Unirea și s. Sonor supuse acțiunii infecției virale, caracterul *lungimea spicului principal* a variat mai lejer în comparație cu s. Galactic, coeficientul de variație atingând valoarea de 11,8 și 13,4 %. Acest fapt indică particularitățile genotipice și reactivitatea specifică a fiecărui genotip.

**Variabilitatea intragenotipică în populațiile orzului de primăvară obținute în condiții de infecție virală în baza polimorfismului proteinelor de rezervă.** Pentru identificarea și soluționarea problemelor asociate variabilității intraspecifice sau intrapopulaționale pe larg sunt utilizate proteinele genetic polimorfe. Polimorfismul unor asemenea sisteme este determinat de variabilitatea aleică și poate fi apreciată prin analize electroforetice. Totalitatea spectrelor proteinelor multiple (poligenice) și genetic polimorfe (polialelice) permite evidențierea poligeniei, structurii alelice, structurii populației, compoziției biotipice a soiului. În evaluarea polimorfismului în populațiile de orz, conform datelor din literatura de specialitate, eficient se utilizează asemenea marcheri proteici ca hordeinele [84], conținutul cărora constituie cca 40% din totalul proteinelor de rezervă.

Analiza electroforetică a hordeinelor extrase din semințele s. Galactic, s. Sonor și s. Unirea a pus în evidență polipeptide cu masa moleculară cuprinsă între 26,0 și 72,0 kDa, cele mai multe fracții fiind distribuite între 55,0 și 26,0 kDa, ceea ce corespunde datelor expuse în literatură și pentru alte genotipuri de orz. Comune pentru toate trei soiuri au fost stabilite 7 polipeptide (30,0; 31,4; 36,0; 37,2; 40,6; 48,5 și 53,0 kDa). Infecția virală separat sau în asociere cu razele gama au indus variații cantitative și calitative în spectrul hordeinelor (Figura 6.1).

În spectrul extractului de hordeine căpătat la s. Galactic din semințele plantelor infectate se remarcă apariția unei benzi cu masa moleculară de 57,5 kDa, iar razele gama în doza 150 Gy în asociere cu infecția virală au condus la formarea unei forme noi de 55 kDa (Figura 6.1 A). O bandă nouă ce reprezintă o fracție cu Mr 62 kDa a fost identificată în loturile s. Sonor cu influență a infecției virale separat sau în asociere cu razele gama în doza de 150 Gy. Razele gama în doza de 100 Gy au indus o izoformă nouă 47 kDa, constatată și în varianta cu aplicare a infecției virale, precum și a VMDO în comun cu razele gama în doza 150 Gy (Figura 6.1. B). Inducerea unei benzi cu Mr 32 kDa a fost remarcată la s. Unirea în cazul infecției virale, aplicării razelor gama în doza 150 Gy sau 250 Gy, precum și a razelor gama 150 Gy în complex cu VMDO.





**Fig. 6.1. Electroforegrama hordeinelor în cariopsele de orz ale soiurilor: A) Galactic, B) Sonor, C) Unirea: 1 – martor; 2 – 100 Gy; 3 – 150 Gy; 4 – 250 Gy; 5 – virus; 6 – 100 Gy+ virus; 7 – 150 Gy+virus; 8 – 250 Gy+virus.**

Razele gama în doza 100 Gy în comun cu infecția virală au cauzat apariția unei fracții 69 kDa, iar iradierea separată în doza 100 Gy a condus la apariția unei forme noi cu masa moleculară 58 kDa. Dispariția unor benzi ce corespund fracțiilor cu Mr în diapazonul 32,4-37 kDa a fost remarcată pentru loturile cu acțiune a razelor gama în dozele 100 Gy și 150 Gy (Figura 6.1.C). Este de remarcă, că cele mai variate profiluri polipeptidice au fost descrise la s. Unirea.

Tipul hordeinelor se stabilește încă în perioada formării bobului și a endospermului, iar genele codificatoare se află sub influența multiplilor factori endo- și exogeni [80]. Diversitatea mare a hordeinelor descrisă la plantele infectate cu virus este condiționată de impactul complex morfofuncțional al patogenului și prezintă un nivel informativ înalt în aprecierea restructurărilor genetice cauzate [7].

**Variabilitatea biotipică a descendenților orzului de primăvară obținuți în condiții de infecție virală în baza polimorfismului proteinelor de rezervă.** Conform profilurilor electroforegramelor, la plantele martor ale s. Galactic, s. Sonor și s. Unirea, similar rezultatelor anterioare, au fost identificate polipeptide cu masa moleculară între 26,0 și 72,0 kDa. Pentru s. Unirea a fost descris un număr maximal de izoforme (15), la s. Galactic – 14, și la s. Sonor – 10 polipeptide. Spectrele hordeinelor în populațiile descendente de la plantele infectate s-au distins calitativ și cantitativ, fiind remarcată menținerea unor variații identificate la plantele infectate sau apariția de noi polipeptide. Astfel, în profilul electroforetic al hordeinelor descendenților VMDO se atestă izoforma 27,5 kDa. Polipeptidele cu masa moleculară 55 kDa și 57,5 kDa înregistrate doar în variantele cu aplicare a infecției virale în asociere cu razele gama au fost descrise și la descendenții acestor genotipuri.

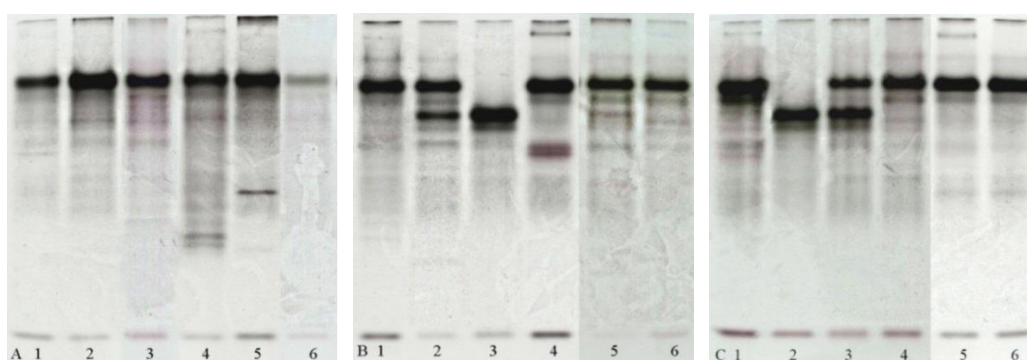
Diferențele stabilite în profilurile hordeinelor derivă din repercusiunile structurale și funcționale descrise la descendenții plantelor infectate și răspunsul specific al genotipului gazdei generat la infecția virală.

**Polimorfismul izofermenților în populațiile orzului de primăvară, obținute în condiții de infecție virală.** În *monitoring*-ul diversității genetice a orzului, de rând cu hordeinele, se utilizează izofermenții [83], precum peroxidazele și esterazele, factori implicați în formarea reacțiilor de răspuns.

Analiza electroforetică a peroxidazelor extrase din frunzulițele s. Galactic, s. Sonor și s. Unirea a pus în evidență izoforme identice caracterizate cu mobilitate minoră

(0,073÷0,363) și majoră (0,773÷0,94), iar pentru formele cu mobilitate medie s-au depistat variații, atât între soiuri, cât și în cadrul diferitelor variante ale aceluiași genotip. Cea mai înaltă diversitate a fost atestată la s. Unirea (11 benzi), în timp ce la s. Galactic – 9, iar la s. Sonor – doar 8. Infecția virală separat sau în asociere cu razele gama a indus variații cantitative și calitative îndeosebi la nivelul izoformelor cu mobilitate majoră. Plantulele s. Galactic și s. Sonor, obținute din varianta cu VMDO, au prezentat un număr mai redus de izoforme, iar la descendenții s. Unirea derivații de la plantele infectate se constată sporirea polimorfismului peroxidazelor, precum și modificări cantitative. Un polimorfism sporit al acestei enzime este înregistrat și la variantele cu aplicare a razelor gama cu dozele 100 Gy și 150 Gy separat sau complementar infecției virale.

Analiza electroforetică a polimorfismului esterazelor denotă devieri mai pronunțate între variantele evaluate. În profilurile esterazei la s. Galactic martor au fost atestate 5 benzi, în timp ce condițiile patologice au generat majorarea polimorfismului (Figura 6.2).



**Fig. 6.2.** Electroforegrama esterazelor în frunzulițele plantulelor de orz de primăvară ale soiurilor Galactic (A), Sonor (B) și Unirea (C) conform variantelor experimentale: 1 – martor, 2 – virus, 3 – 100 Gy, 4 – virus+100 Gy, 5 – 150 Gy, 6 – virus+150 Gy.

Numărul de izoforme în cazul infecției virale în complex cu razele gama 100 Gy a atins valoarea de 12. La acest soi a fost descrisă apariția de noi componente cu mobilitatea cuprinsă între 0,456÷0,712. Se consideră, că locusurile Est 6, 7 și 8 prezintă stabilitate și sunt mai puțin influențate de diverși factori. Izoformele specifice acestor locusuri au fost remarcate doar în variantele „Virus” și „100Gy+virus” a s. Galactic. La plantele martor ale s. Unirea se disting izoformele Est 1 – Est 2, locusurile cărora, conform datelor din literatură sunt strâns linkate și pentru care nu se înregistrează recombinații. În variantele experimentale se atestă doar componenta Est2, ceea ce confirmă efectul recombinogen al VMDO. Izoforma Est 5 a prezentat o variabilitate sporită la toate trei genotipurile în condiții de patogeneză.

Înlănțuirea locilor esterazei cu caractere agronomice importante, precum și interrelațiile dintre peroxidază și rezistența la boli și adaptabilitate, indică asupra posibilității utilizării acestor enzime în *screening*-ul genotipurilor cu diferite caractere valoroase. În baza rezultatelor cu privire la impactul produs de VMDO la descendenții plantelor infectate a fost elaborat un procedeu nou de obținere a genotipurilor noi de orz cu caractere de interes agronomic [3], esența căruia rezidă în inducerea diversității genetice și selectarea formelor ce prezintă însușiri nespecifice soiului inițial ale unor asemenea caractere cantitative precum talia plantei, lungimea ultimului internod și a spicului, numărul de spiculețe dezvoltate, numărul de internoduri.

### 6.3. Impactul virusului mozaicului conopidei în inducerea variabilității somaclonale la plantele gazdă

Pentru virusurile ce utilizează aparatul nuclear în reproducerea acidului nucleic propriu, precum VMCo, prezintă interes studierea proliferărilor celulare în diferite sisteme citopatice.

**Calusogeneza și capacitatea regenerativă a explantelor de varză sub influența VMCo.** Prin cercetări morfologice s-a stabilit, că VMCo induce la plantele gazdă un spectru variat de modificări, inclusiv malformații, terate, tumori nervuriene sau radiculare. În acest context, pentru evaluarea proliferării *in vitro* au fost selectate țesuturi cu diferit grad al malformațiilor în baza cărora a fost optimizat procedeul de inițiere și proliferare calusală cu selectarea mediului nutritiv MS suplimentat cu BAP (0,5 mg/l), ANA (0,5 mg/l), chinetină (0,01 mg/l), sucroză (2%), agar (0,7%), care a permis generarea calusului la a 7-9-a zi după inoculare și obținerea regeneranților după 4-5 pasaje. Analiza calusogenezei pentru sistemele citopatice formate din țesuturi ale mezofilului plantelor infectate a stabilit un grad deosebit de proliferare celulară *in vitro* (Tabelul 6.2).

**Tabelul 6.2. Influența virusului mozaicului conopidei asupra capacității de calusogeneză a diferitelor zone citopatice la unele soiuri de varză**

| Genotip | Variantă                          | <i>B. oleracea</i><br>var. <i>botrytis</i> | <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> |             |
|---------|-----------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------|
|         |                                   |                                            | s. Haricovscaia                         | s. Podaroc  |
| Martor  | țesuturi sănătoase                | 55,6±6,6                                   | 62,5±5,7                                | 46,3±7,7    |
|         | țesuturi nemodificate             | 25,3±3,7***                                | 51,7±8,3*                               | 30,1±1,9*   |
|         | țesuturi malformate               | 51,4±9,1                                   | 71,4±6,8                                | 80,0±6,2*** |
|         | țesuturi adiacente malformațiilor | 16,7±4,1***                                | 27,3±5,2***                             | 25,4±3,2*** |

\*, \*\*\* – diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,05$ ; 0,001, respectiv.

Cel mai redus nivel, cu 45 – 70% comparativ cu martorul sănătos, a fost stabilit pentru zonele adiacente malformațiilor. Frecvența calusogenezei în țesuturile malformate a fost aproximativ la nivelul valorii martorului sau mai ridicată, în dependență de genotip [8]. Cercetările efectuate cu diferite tipuri de histopatosisteme a pus în evidență influența infecției virale cu o putere de influență de 35% asupra calusogenezei comparativ cu 18% pentru regenerare. Variația regenerării în dependență de genotip a fost în jurul valorii de 50%.

**Variabilitatea parametrilor biomorfologici ai somaclonelor de varză obținute din explante infectare cu VMCo.** Somaclonele „Martor” și „Virus” au prezentat deosebiri pentru 2 din 7 caractere analizate (lungimea tulpiniței și conținutul substanțelor uscate). Astfel, plantulele regenerate din țesut infectat aveau o tulpină cu 45,59% mai lungă față de cele derivate din țesut sănătos și un conținut de substanțe uscate de peste 17-18% mai sporit. Totodată, în baza estimărilor individuale se atestă extinderea variabilității generate *in vitro*, fiind descrisă o varianță pronunțată generată de VMCo, puterea de influență a parametrului constituind 50%. Aceste rezultate au fundamentat reperele procedeului de sporire a variabilității somaclonale la varză [1]. Conform invenției propuse, infecția virală eficientizează cultura *in vitro* a țesuturilor în vederea sporirii variațiilor somaclonale.

## CONCLUZII GENERALE

1. Cercetările interdisciplinare ale patogenezei virale la plantele de cultură (tomate, orz, varză) au constatat manifestarea unor reacții diferențiate la nivel intracelular, celular, tisular și de organism la genotipurile cu diferit grad de sensibilitate, ceea ce a stat la baza fundamentării variabilității în fitopatosistemele *gazdă x virus* și elaborării unor procedee de identificare a genotipurilor rezistente.
2. Modificările structurale ale componentelor celulelor sporogene, mezofilului și calusale în condițiile de infecție virală se realizează printr-un șir de reorganizări cu caracter specific (asociat replicării și localizării virionilor virali) și nespecific, manifestat în baza principiilor restructurărilor tipice (intensificării, compensării, extinderii și suplinirii funcțiilor) (cap. 3, [2]).
3. Virozele cauzate de virusurile aspermiei tomatelor, X al cartofului, mozaicului dungat al orzului, mozaicului conopidei la plantele de cultură gazdă sunt complementate de modificări ale diviziunilor mitotice și meiotice, exprimate prin abateri ale procesului de recombinare omoloagă, inducerea de anomalii cromozomale și cromatidice, distribuții neuniforme între celulele fiice. Efectele induse asupra procesului de meioză sunt dependente de sistemul virus-plantă, fiind determinate de genotipul gazdei în proporție de cca 50%. Puterea de influență a infecției virale variază între 36 și 18% în funcție de entitatea virusului (cap. 4, [13; 15; 17]).
4. Impactul infecției virale asupra recombinării meiotice (frecvența și spectrul *crossing-over*-ului meiotic) și somatice (schimbările între cromatidele surori) denotă capacitatea genotoxică a virusurilor aspermiei tomatelor, X al cartofului, mozaicului dungat al orzului exprimată prin majorarea frecvenței de schimburi cromatidice în celulele proliferative ale plantelor gazdă (cap. 4, [17]; cap. 5, [4; 18]).
5. Evaluarea particularităților proliferărilor celulare a demonstrat reducerea procentului de anomalii și majorarea frecvenței conjugării mitotice și meiotice la descendenții obținuți de la plantele infectate. Repercursiunile diviziunilor celulare stabilite la descendenții liberi de germenii virali induc la apariția de forme cu noi combinații alelice, ceea ce confirmă posibilitatea utilizării virusurilor în calitate de factori recombinogeni (cap. 4, [13; 15]).
6. Studiul citologic al diviziunilor mitotice a demonstrat efectul mitodepresiv al virusului mozaicului dungat al orzului asupra radiclelor de orz și inducerea de anomalii care au la bază dereglări ale fusului de diviziune, așa cum ar fi C-mitozele, ceea ce exprimă caracterul aneugen al agentului patogen (cap. 5, [17; 18]).
7. A fost demonstrată influența virusului mozaicului dungat al orzului asupra expresiei genelor implicate în metabolismul antioxidant (APX și SOD) și proteinelor asociate patogenezei (PR-3, PR-5 și PR-10) la plantele gazdă sensibile și descendenții obținuți în condiții de patogeneză virală (cap. 5, [19]).
8. Aplicarea morfometriei citoplasmatică a scos în evidență modificări în direcția majorării coraportului dintre cromatina condensată și decondensată, precum și a raportului nucleo-plasmatic în celulele mezofilului plantelor de tomate infectate cu virusul aspermiei tomatelor sau X al cartofului, celulele calusale derivate din diferite explante ale genotipurilor de varză infectate cu virusul mozaicului conopidei. Reorganizările topologice și structurale ale constituenților nucleari reflectă un efect de poziție (*Position effect variegation*) și o activitate transcripțională diferențiată (cap. 5, [16]).

9. Variabilitatea atestată la somaclonele de varză, regenerate de la plante infectate cu virusuri, după unii indici morfologici (lăţimea, lungimea frunzuliţelor; raportul lăţime/lungime a frunzuliţelor; numărul de frunzuliţe; lungimea rădăcinii, tulpiniţei) şi biochimici (conţinutul de substanţe uscate, proteine totale; activitatea peroxidazei) a scos în evidenţă extinderea diversităţii, contribuţia procentuală a caracterului analizat constituind peste 60%. Drept indici relevanţi în evaluarea diversităţii somaclonale generate de infecţia virală pot fi utilizaţi lungimea tulpiniţei şi conţinutul de substanţe uscate (cap. 6, [1]).
10. În baza analizei caracterelor morfofiziologice, biochimice în populaţiile de tomate libere de virusuri descendente de la părinţi infectaţi a fost stabilită extinderea distribuţiei valorilor caracterelor cantitative, precum ar fi numărul total de fructe per plantă, masa unui fruct, numărul de seminţe a unui fruct, numărul de chiorchine cu fructe. Evaluarea coeficientului de variaţie a caracterelor studiate a scos în evidenţă posibilitatea modificării interdependenţei dintre unele caractere moştenite în *linkage* (cap. 6, [6; 14; 20]).
11. Investigaţiile citogenetice ale proliferării celulare în condiţiile de infecţie virală au demonstrat însuşirile mitogene şi genotoxice ale agenţilor virali dependente de particularităţile sistemului genotip gazdă-patogen. Modificările induse de fitovirusuri se realizează prin reacţii de răspuns a plantelor la factorii exogeni determinate genetic şi epigenetic (cap. 6).

## RECOMANDĂRI PRACTICE

1. În scopul extinderii variabilităţii genetice şi obţinerii de forme cu caractere nespecifice formelor iniţiale la tomate, orz de primăvară se propune utilizarea procedeelor bazate pe infectarea gazdelor şi selectarea genotipurilor cu îmbinări netipice la descendenţii plantelor infectate cu virusuri.
2. Activitatea polifenoloxidazei, gradul de înmagazinare al  $\alpha$ -tomatinei se recomandă pentru aplicare în diferenţierea reacţiei genotipurilor de tomate la infecţiile virale.
3. Izoformele esterazelor specifice locilor Est 1 – Est 2 pot fi utilizate în aprecierea efectelor recombinogene, Est 5 şi spectrul polimorfic al hordeinelor – pentru estimarea polimorfismului biotipic indus de infecţia virală la orzul de primăvară.
4. Nivelul de expresie relativă a genei PR-5 se recomandă pentru utilizare în testarea patogenităţii genotipurilor de orz la virusul mozaicului dungat al orzului.
5. Utilizarea în cultura *in vitro* a explantelor de mezofil cu origine citopatică virală poate fi aplicată în obţinerea de regeneranţi cu un spectru mai larg de variaţii morfologice şi a caracterelor cantitative faţă de metoda tradiţională de creare a somaclonelor.
6. Rezultatele evaluării compartimentării celulare şi tisulare, diviziunilor celulare, relaţiilor gazdă-patogen constituie suport metodologic în asigurarea cursurilor disciplinelor *Biologia celulară*, *Histologie vegetală* şi lucrărilor practice *Metode citologice de examinare a celulelor şi ţesuturilor* pentru studenţii cilului I, Universitatea de Stat din Moldova.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **ANDRONIC, L.** *Procedeu de obținere a somaclonelor de varză*. Brevet de invenție nr.461 din 03.06.2011. In: BOPI nr.1, 2012, p.26.
2. **ANDRONIC, L., BUJOREANU, V.** Virusurile tomatelor – citopatologie și diagnostic. In: *Agricultura Moldovei*, nr. 1-2, 2015, pp.31-34.
3. **ANDRONIC, L., GRIGOROV, T., BUJOREANU, V.** *Procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară*. Brevet de invenție nr.251 din 22.04.2010. In: BOPI nr.8, 2010, pp.28-29.
4. **ANDRONIC, L., JACOTĂ, A.** Evidența schimburilor între cromatidele surori la orz (*Hordeum vulgare* L.) în cazul infecției virale. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2009, nr.2 (308), pp. 57-64.
5. **ANDRONIC, L. JACOTĂ, A., GRIGOROV, T. et al.** Studiul diviziunilor mitotice în meristemele radiculare la orz în diverse condiții de patogeniza virală. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2009, nr. 3(309), pp. 74-81.
6. **ANDRONIC, L., JACOTĂ, A., BUJOREANU, V.** *Procedeu de obținere a recombinanților la tomate*. Brevet de invenție nr.200 din 21.10.2009. In: BOPI nr.5, 2010, pp. 33-34.
7. **ANDRONIC, L., RUDACOVA, A., ROTARI, A.** Polimorfismul proteinelor de rezervă în populațiile orzului de primăvară (*Hordeum vulgare* L.) obținute în condiții de infecție virală. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2011, nr. 1 (313), pp. 73-79.
8. **ANDRONIC, L.** Studiul variabilității somaclonale induse de virusul mozaicului conopidei la plantele gazdă. In: *Analele USM, Studia Universitatis*, 2008, vol. 7 (17), pp.28-32.
9. **BADEA, E., SÂNDULESCU, D.** *Biotehnologii vegetale*. Biotech, București, 2001, 295 p.
10. **DUCA, M.** Aspecte privind mecanismele de rezistență ale florii-soarelui la lupoaie. In: *Akademios*, nr. 4 (55), 2019, pp.34-43.
11. **GRIGOROV, T., SMEREA, S., ANDRONIC, L., BERZOI, V.** Variabilitatea caracterelor cantitative la orz în generațiile M<sub>0</sub>-M<sub>3</sub> la plantele supuse acțiunii infecției virale. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2013, nr. 3 (321), pp.83-89.
12. **ANAND, S., TIKOO, S.** Viruses as modulators of mitochondrial functions. In: *Adv Virol.* 2013, pp.1-17.
13. **ANDRONIC, L.** Analysis of meiotic recombination in barley (*Hordeum vulgare* L.) under viral pathogenesis. In: *Vegetable breeding and seed production*. Collection of scientific papers. VNIISOK. Moscow. 2014, vol. 45, pp. 76-86.
14. **ANDRONIC, L., SMEREA, I., VOINU, M.** Phenotypic expression and variance of quantitative traits in tomato progenies obtained from tomato plants infected with viruses. In: *Agrophysics trends: from actual challenges in arable farming and crop growing towards advanced technologies*. Int. Conf. Saint Petersburg, 2017, pp. 422-426.
15. **ANDRONIC, L.** Influence of viral infection on meiotic progression in tomatoes cultivars. In: *Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы*. Научно-практическая конференция. ВНИИСОК, Москва, 2015, с. 62-69.
16. **ANDRONIC, L.** Nucleotypic effects in *in vitro* condition of different cabbage genotypes infected with cauliflower mosaic virus. Proceeding materials of International Conference “A New Approach of the Academic Research in Biology”. Bucharest, 2012, p.34-36.
17. **ANDRONIC, L.** Viruses as trigger of DNA damage in host plants. In: *Canadian Journal of Plant Science*. 2012, vol. 92 (6), pp.1083-1091.
18. **ANDRONIC, L. et al.** Genotoxicity of barley stripe mosaic virus in infected host plants. In: *Central Eur J Biol.* 2010, vol.5 (5), pp. 633-640.
19. **ANDRONIC, L., PORT, A., DUCA, M.** Expression of some genes in barley under viral infection. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2015, 2 (326), pp.59-65.
20. **ANDRONIC, L., SMEREA, S., MARIU, L.** Variance of quantitative traits in tomato progenies obtained from tomato plants infected with viruses. In: *Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции сельскохозяйственных растений V Международная научно-методологическая конф.*, Москва, 2019, Том II, с.7-11.
21. **ANDRONIC, L.** Evidence of meiotic recombination in virus infected tomato. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2010, nr. 2 (311), pp. 8-16.
22. **BERNARDO, R.** *Breeding for quantitative traits in plants*. Second edition. 2010. Stemma Press Woodbury, Minnesota. 2010, 400 p. (p.11).



23. BOND, D., FINNEGAN, E. Passing the message on: Inheritance of epigenetic traits. In: *Trends in Plant Science*. 2007, vol. 12 (5), pp. 211-216.
24. BOYKO, A., KOVALCHUK, I. Genetic and epigenetic effects of plant–pathogen interactions: An Evolutionary Perspective. In: *Molecular Plant*. 2011, vol. 4 (6), pp. 1014-1023.
25. BOZSAKYOVÁ, E., WSÓLOVÁ, L., CHALUPA, I. Spontaneous and gamma-ray-induced sister chromatid exchanges in patients with carcinoma of cervix uteri. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 2005. Vol. 81, nr. 2, pp. 177-185.
26. CAI, X., XU, S. Meiosis-driven genome variation in plants. In: *Curr. Genomics*, 2007, 8(3), pp. 151–161.
27. CATALÁ, M., NUEZ F. Tomato fruit set under low temperatures. In: *Acta Horticulturae*. 1990, nr. 287, pp. 171-178.
28. CHIRIAC, Gh., **ANDRONIC, L.**, BUJOREANU, V., MARI, L. Features of *crossing-over* in virus-infected tomato. In: *Centr. Eur. J Biol.* 2006, vol.1 (3), pp. 386-398.
29. CLARKE, S., GUY, P., BURRITT, D., JAMESON, P. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. In: *Physiol Plant*. 2002, 114, pp. 157–164.
30. CORNFORTH, M., BEDFORD, J. Ionizing radiation damage and its early development in chromosomes. In: *Adv. in radiation biology*. 1993, vol. 17, pp. 507-511.
31. CULVER, J., PADMANABHAN, M. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. In: *Annu Rev Phytopat.* 2007, vol. 45, pp. 221–243.
32. DÍAZ, E., JORDÀ, M., PEINADO, M. et al. Epigenetics of host–pathogen interactions: The Road Ahead and the Road Behind. In: *PLoS Pathogens*. 2012, vol.11, e1003007.
33. DONG, X. Pathogen-induced systemic DNA rearrangement in plants. In: *Trends in Plant Science*. 2004, vol. 9, pp. 60-61.
34. EINI, O. Geminiviral encoded supressor of gene silencing. In: *Geminiviruses: Impact, Challenges and Approaches*. R.V. Kumar (ed.), Springer Nature Switzerland, 2019, Cap. 5.5. pp.182- 196.
35. EL-GHAMERY, A., EL-NAHAS, A., MANSOUR, M. The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *A. cepa* and *V. faba*. In: *Cytologia*. 2000, vol.65, pp.277-287.
36. FASAHAT, P., RAJABI, A., MAHMOUDI, S. et al. An overview on the use of stability parameters in plant breeding. In: *Biom Biostat Int J*. 2015, vol. 2 (5), pp. 149-159.
37. FORSTERA, B., SHU, Q. Plant mutagenesis in crop improvement: basic terms and applications. In: *Plant mutation breeding and biotechnology*, Edited by Shu Q. et al., 2012, 608 p., Ch. 1, p. 9.
38. GARCÍA, C., NEPI, M., PACINI, E. It is a matter of timing: asynchrony during pollen development and its consequences on pollen performance in angiosperms. In: *Protoplasma*, 2017, vol. 254 (1), pp. 57-73.
39. GHORBANI, F., ARZANI, A., POURSIABIDI, M. Meiotic instability in *Aegilops cylindrica*: a comparison with stable meiosis in *Triticum monococcum* subsp. *aegilopoides*. In: *Caryologia*. 2015, vol. 68, pp. 101–108.
40. HAWLEY, R. S. Meiosis in living color: Fluorescence-based tetrad analysis in *Arabidopsis*. In: *Pr. of the National Acad. of Sc.*, USA. 2007, vol. 104, pp. 3673–3674.
41. <http://www.q-bank.eu/Virus/> (citat 17.07.2019).
42. HULL, R. *Plant viruses*. 5<sup>th</sup> edition. John Innes Centre, Norwich, UK. 2014.
43. JACKSON, A., LIM, H.-S., BRAGG, J. et al. Hordeivirus Replication, Movement, and Pathogenesis. In: *Annual Review of Phytopathology*, 2009, vol. 47, pp. 385-422.
44. KAO, F., CHENG, Y., CHOW, T. An integrated map of *Oryza sativa* L. chromosome 5. In: *Theor. Appl. Genet.* 2006, vol. 112, pp. 891-902.
45. KASUGA, T., GIJZEN, M. Epigenetics and the evolution of virulence. In: *Trends in Microbiology*. 2013, vol. 21 (11), pp. 575-582.
46. KAUR, D., SINGHAL, V. Chromosome number, meiosis and pollen fertility in *Vicia rigidula* Royle and *V. tenera* from cold desert regions of India. In: *Cytologia*. 2010, vol. 75, pp. 9–14.
47. KOGOVSEK, P., POMPE-NOVAK, M., BAEBLER, S. et al. Aggressive and mild Potato virus Y isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants. In: *Plant Pathology*. 2010, vol. 59, pp. 1121–1132.

48. KOIWA, H., SATO, F., YAMADA, Y. Characterisation of accumulation of tobacco PR-5 proteins by IEF-immunoblot analysis. In: *Plant Cell Physiol.* 1994, vol. 35(5), pp.821-827.
49. KOPEK, B. G., PERKINS, G., MILLER, D. J. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. In: *PLoS Biol.* 2007; 5:e220.
50. KOROL, A., PREYGEL, I., PREYGEL, S. *Recombination variability and evolution. Algorithms of estimation and population-genetic models.* Chapman & Hall, London. 1994. 362 p.
51. KOVALCHUK, I., KOVALCHUK, O., KALCK, V. Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. *Nature (Lond.)*. 2003, vol. 423, pp. 760-762.
52. LALIBERTE, J., SANFACON, H. Cellular remodeling during plant virus infection. In: *Annu Rev Phytopathol.* 2010, vol. 48, pp. 69–91.
53. LAM, I., KEENEY, S. Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. In: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2014, vol. 7 (1), a016634.
54. LI, J., DUKOWIC-SCHULZE, S., LINDQUIST, I. et al. The plant-specific protein FEHLSTART controls male meiotic entry, initializing meiotic synchronization in Arabidopsis. In: *The Plant J.* 2015, vol. 84, pp. 659–671.
55. LOVE, A., YUN, B., LAVAL, V. et al. Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of *Arabidopsis*, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. In: *Plant Physiol.* 2005, vol. 139, pp. 935–948.
56. LUCHT, J., MAUCH-MANI, B., STEINER, H. Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. In: *Nature Genetics.* 2002, vol. 30, pp. 311-314.
57. LUKENS, L., ZHAN, S. The plant genomes methylation status and the response to stress: implications for plant improvement. In: *Current Opinion in Pl. Biol.* 2007, vol. 10, pp. 317-322.
58. LYLES, D. Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNAviruses. *Microbiol. In: Mol. Biol. Rev.*, 2000, vol. 64 (4), pp. 709–724.
59. LYNN, A., ASHLEY, T., HASSOLD, T. Variation in human meiotic recombination. In: *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2004, vol. 5, pp. 317–349.
60. MACKAY, T., STONE, E., AYROLES, J. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. In: *Nature Reviews Genetics*, 2009, vol. 10, pp. 565–577.
61. MADLUNG, A., COMAI, L. The effect of stress on genome regulation and structure. In: *Ann. Bot.* 2004, vol. 94, pp. 481–495.
62. MALUSZYNSKA J., JUCHIMIUK J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. In: *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 2005, vol. 56, pp. 177-184.
63. MATHEW, T., KURIACHAN, P. Cytological Studies of *Solanum jasminoides* Paxt. var. *grandiflorum* Hart. In: *Cytologia.* 1989, vol. 54, pp. 661-666.
64. McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. In: *Sciences.* 1984, vol. 226, pp. 792-801.
65. MISIK, M., MA, T-H., NERSESYAN, A. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update. In: *Mutagenesis.* 2011, vol. 26, no. 1, pp. 215-221.
66. MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M. et al. Reactive oxygen gene network of plants. In: *TRENDS Plant Sci.* 2004, vol. 9 (10), pp. 490-498.
67. MOLINIER, J., RIES, G., ZPFEL, C., HONHN, B. Transgenerational memory of stress in plants. In: *Nature.* 2006, vol. 442, pp. 1046-1049.
68. MORGAN, D. Meiosis. *The Cell Cycle: Principles of Control.* Chapter 9. London: New Science Press Ltd. 2007.
69. PALLAS, V., GARCIA, J. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. In: *Journal of General Virology.* 2011, vol. 92, pp. 2691–2705.
70. PANDEY, R. Cytotoxic effects of pesticides in somatic cells of *Vicia faba* L. In: *Цитология и генетика.* 2008, nr. 6, pp. 13-18.
71. SANG, N., LI, G. Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. In: *Mut. Res.* 2004, vol. 560, no. 2, pp. 159-165.
72. SATOH, K., KONDOH, H., DE LEON, T. et al. Gene expression responses to Rice tungro spherical virus in susceptible and resistant near-isogenic rice plants. In: *Virus Research.* 2013, vol. 171 (1), pp. 111–120.

73. SILVA-BELTRÁN, N., RUIZ-CRUZ, S., CIRA-CHÁVEZ, L. et al. Total phenolic, flavonoid, tomatine, and tomatidine contents and antioxidant and antimicrobial activities of extracts of tomato plant. In: *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015, vol. 11, pp.1-10.
74. VELAZHAHAN, R., DATTA, S., MUTHUKRIHNNAN, S. The PR-5 family: thaumatin-like proteins. In: *Pathogenesis-related proteins in plants*. 1999. CRC Press. Edited Datta S., Muthukrihnan S., p.107-129.
75. WESTERMAN, M. Chiasma frequency and variability of morphological characters in populations of two grasshopper species. In: *Heredity*. 1983, vol. 51, (1983), pp. 501-506.
76. YANG, J., KANG, X. Microsporogenesis and flower development in *Eucalyptus urophylla* × *E. tereticornis*. In: *Breed Sci*. 2015, vol. 65, pp. 138–144.
77. YI, H., LUI, J., ZHENG, K. Effect of sulfur dioxide hydrates on cell cycle, sister chromatid exchange, and micronuclei in barley. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2005, vol. 62, pp.421-426.
78. БУТОРИНА, А. К., ДО НЬЫ ТИЕН. Ритмы суточной митотической активности у золотистой фасоли *Vigna radiata* L. In: *Цитология*. 2008, т. 50, nr.8, с. 729-733.
79. ИЛЬИНСКИХ, Н. Н., КСЕНЦ, А., ИЛЬИНСКИХ, Е. Н. и др. *Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность*. Томск, Изд-во Томского ун-та, 2011, 312 с.
80. КИМ, ДЖ. Ю., ЛИ, М. С., ЯНГ, С. З. и др. Молекулярная характеристика кДНК, кодирующей дисульфидизомеразу, из развивающихся зерновок ячменя. In: *Физиология растений*. 2008, Т.55 (5), с. 752-762.
81. ЛОГИНОВА, Д. Б., СИКОВА, О. Г. Механизмы образования нередуцированных гамет у цветковых растений. In: *Генетика*. 2017, т. 53, nr. 7, с.769-784.
82. МАЛИНОВСКИЙ, В. И. *Механизмы устойчивости растений к вирусам*. Владивосток Дальнаука, 2010, 324 р.
83. НЕЦВЕТАЕВ, В. П., ШЕРЕМЕТ, А. М., НЕЦВЕТАЕВА, О. В. Морозостойкость озимого ячменя и аллельное состояние по локусам, контролирующим качественные биохимические и морфологические признаки. In: *Научные ведомости*, 2006, nr. 3 (23), вып. 4, с. 133-140.
84. ПОМОРЦЕВ, А. А., МАРТЫНОВ, С. П., ЛЯЛИНА, Е. В. Полиморфизм горден-кодирующих локусов в местных популяциях культурного ячменя (*Hordeum vulgare* L.) стран Ближнего Востока. In: *Генетика*. 2008, т. 44, nr. 6, с. 815-828.

## ADNOTARE

Andronic Larisa, "Citogenetica procesului de patogeneză virală la plantele de cultură"  
Teză de doctor habilitat în științe biologice. Chișinău, 2020

**Structura tezei:** introducere, 6 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie (490 titluri), 8 anexe, 209 pagini conținut de bază, 45 tabele, 54 figuri. Rezultatele au fost publicate în 74 lucrări științifice.

**Cuvinte cheie:** citogenetică, plante de cultură, virusuri, recombinare meiotică, recombinare somatică, markeri proteici, microsporogeneză, patogeneză virală, ultrastructură, variabilitate genetică.

**Domeniul de studiu:** Genetică vegetală

**Scopul cercetărilor:** elucidarea impactului agenților virali în inducerea variabilității genetice și stabilirea efectelor citogenetice ale patogenezei virale la plantele de cultură în baza identificării particularităților proliferărilor mitotice și meiotice în sisteme compatibile gazdă-patogen.

**Obiectivele studiului:** identificarea modificărilor induse de infecțiile virale în sisteme celulare diferențiate și în diviziune activă la plantele de cultură (orz, tomate, varză) infectate cu virusuri ARN sau ADN; stabilirea particularităților diviziunilor meiotice și mitotice în diverse sisteme gazdă-patogen; evaluarea impactului infecțiilor virale asupra procesului de recombinare meiotică și somatică în dependență de particularitățile sistemului gazdă-patogen; determinarea specificului proceselor de diviziune celulară la descendenții obținuți în condiții de patogeneză virală; estimarea variabilității genetice la plantele infectate și descendenții acestora; aprecierea genotoxicității agenților virali la plantele gazdă; identificarea mecanismelor implicate în procesul de generare a variabilității genetice induse de infecțiile virale; elaborarea procedurilor de inducere și apreciere a variabilității genetice precum și de selectare a genotipurilor recombinante în baza aplicării infecției virale.

**Noutatea și originalitatea științifică:** argumentarea conceptului privitor la efectele genetice produse de infecțiile virale la gazdele susceptibile, rezultate care confirmă posibilitatea utilizării fitovirusurilor în calitate de inductori ai variabilității, care prin modul lor de interacțiune cu planta-gazdă modifică structura internă, reorientează procesele de transcripție și translație din celulă, afectând procesele proliferative, expresia genelor și variația caracterelor. Dovedită posibilitatea aplicării virusurilor, comparabil factorilor fizici (razelor gama), în modificarea expresiei genelor, mărirea spectrului de recombinării și extinderea variabilității genetice, reconfirmări ce pot fi transmise la descendenții plantelor infectate.

**Rezultate principial noi obținute:** Virozele cauzate de VAT, VXC, VMT, VMDO și VMCo condiționează modificări macro- și microstructurale în celulele infectate (țesuturi asimilatoare, de protecție), precum și lipsite de germeni virali (țesuturi arhesporale, meristematice), exprimând reacții specifice și stereotipice. La nivelul țesuturilor compatibile procesului infecțios (organe vegetative și reproductive) și incompatibile pentru germenii virali (microspori) se expune sensibilitate celulară diferențiată. Demonstrat impactul virusurilor în conjugarea cromozomilor, distribuirea materialului genetic între celulele fiice, comparabil razelor gama; stabilite efecte destabilizatoare ale microsporogenezei la genotipurile de tomate și orz infectate cu virusuri ce condiționează sporirea asincronismului și accelerarea promovării etapelor meiozei; stabilite însușirile genotoxice și mitogene ale virusurilor ARN la gazde și descendenții plantelor infectate ce includ modificări ale recombinării somatice; perturbarea diviziunilor mitotice, modificări ale expresiei genelor implicate în metabolismul antioxidant (APX și SOD) și proteinelor asociate patogenezei (PR-3, PR-5 și PR-10); dovedit efectul nucleopatic exprimat prin reconfirmări ale cromatinei pentru virusul ADN.

**Semnificația teoretică:** Răspunsul plantelor la infecțiile virale la nivel ultrastructural se exprimă prin reorganizări cu caracter specific care pot servi criteriu pentru detectarea patogenului, și nespecific, manifestat în baza principiilor restrukturărilor tipice, ce reflectă patogenitatea agentului viral. Impactul virusurilor la gazdele sensibile condiționează reacții care accentuează asincronismul diviziunilor celulare, eterogenitatea modificărilor morfofuncționale și genetice. Stabilite abateri ale expresiei genelor implicate în metabolismul antioxidant (APX și SOD), proteinelor asociate patogenezei, dependente de specificitatea patosistemelor, care pot fi utilizate în identificarea genotipurilor cu diferită sensibilitate la agentul viral.

**Valoarea aplicativă:** Elaborate procedee de inducere a variabilității genetice la plantele de cultură (tomate, orz, varză) cu aplicarea infecției virale ca factor recombinogen și apreciere a diversității în baza markerilor proteici (hordeinelor), enzimatici (peroxidazelor, esterazelor), moleculari (PR-5).

**Implementarea rezultatelor științifice:** procedeele elaborate au fost aplicate în diversificarea spectrului de forme ce îmbină caractere cantitative agronomice valoroase și obținerea soiurilor noi de tomate; rezultatele științifice au servit ca suport metodologic pentru asigurarea cursurilor *Biologia celulară*, *Histologie vegetală* și lucrărilor practice *Metode citologice de examinare a celulelor și țesuturilor* (ciclul I și II), USM.

## ANNOTATION

Andronic Larisa, "Cytogenetics of the viral pathogenesis in crop plants"

Thesis of doctor habilitatus in biological sciences. Chisinau, 2020

**Thesis structure:** The thesis consists of an introduction, 6 chapters, general conclusions and recommendations, a bibliography composed of 490 titles, 8 annexes, 209 pages of basic content, 45 tables, 54 figures. The obtained results were published in 74 scientific papers.

**Field of study:** Plant Genetics

**Key words:** cytogenetics, crop plants, viruses, meiotic recombination, somatic recombination, protein markers, microsporogenesis, viral pathogenesis, ultrastructure, genetic variability.

**The aim of the research:** elucidation of the impact of viral agents as inducers of genetic variability and establishment of the cytogenetic effect of viral pathogenesis in crop plants based on the particularities of mitotic and meiotic proliferations in host-pathogen compatible systems.

**Objectives:** identification of changes induced by viral infections in differentiated and actively dividing cell systems in crop plants (barley, tomato, cabbage) infected with RNA or DNA viruses; establishment of the particularities of meiotic and mitotic divisions in various host-pathogen systems; evaluation of the viral agents impact on the process of meiotic and somatic recombination depending on the peculiarities of the host-pathogen system; determination of the specificity of cell division processes in offspring obtained under conditions of viral pathogenesis; estimation of genetic variability in infected plants and their progenies; assessment of the genotoxicity of viral agents in host plants; identification of the mechanisms involved in the genetic variability induction; elaboration of procedures for induction, appreciation and selection of useful variability based on the application of viral infection as a recombinogenic factor.

**Scientific novelty and originality:** the concept of genetic effect produced by viral infections in susceptible hosts, that confirm the possibility of phytoviruses using as inducers of variability, conducting to the internal structure, transcription and translation, affection of proliferative processes, gene expression, and traits variation was argued. The confirmation of the involvement of viruses, comparable to physical factors (gamma rays), in changing genes expression, increasing of the recombination spectrum and expanding of genetic variability, reconformations that can be transmitted to the offspring of infected plants.

**The main new results for science and practice:** Pathogenesis caused by TAV, PXV, TMV, BSMV and CaMV established macro- and microstructural changes in infected cells (assimilation and protective tissues), as well as in free of viral germs (arhesporale and meristematic tissues), expressing specific and stereotypical reactions. The cellular differentiated sensitivity was established at the compatible tissues level on vegetative and reproductive organs and incompatible for viral particles (microspores). The impact of viruses on the chromosomes conjugation, and the distribution of genetic material between daughter cells comparable to gamma rays was demonstrated; destabilizing effect of microsporogenesis on virus-infected tomato and barley were established, that condition increased asynchronism and acceleration of the meiosis promotion; established the genotoxic and mitogenic effect of RNA viruses in hosts and offspring of infected plants that include changes in somatic recombination, disruption of mitotic divisions, changes in the expression of genes involved in antioxidant metabolism (APX and SOD) and pathogenesis-related proteins (PR-3, PR-5 and PR-10); the nucleopathic effect was proved, expressed by chromatin reconformations for DNA virus.

**The theoretical significance of the work:** the response of plants to the viral infections on ultrastructural level is expressed by specific reorganizations that can serve as a criterion for pathogen detection, and non-specific, manifested based on the principles of typical transformations, reflecting the pathogenicity of the viral agent; the viral infection on susceptible hosts causes a wide range of reactions that accentuate the cell divisions asynchronism and heterogeneity of morpho-functional and genetic changes. Specific deviations of the expression of genes involved in antioxidant metabolism (APX and SOD), pathogenesis-associated proteins (PR), depending on the pathosystems specificity can be used in identification of genotypes with different sensitivity to the viral agent.

**Applicative value:** The procedures for inducing genetic variability in crop plants (tomato, barley, cabbage) were elaborated, with the application of viral infection as recombinogenic factor and appreciation of diversity based on protein (hordein), enzymatic (peroxidase, esterase) and molecular (PR-5) markers.

**Implementation of scientific results:** the elaborated procedures were applied in diversification of the spectrum of genotypes with agronomical valuable quantitative characters and new varieties of tomatoes obtaining; the scientific results served as support for courses Cell Biology, Plant Histology and practical works Cytological methods for cell and tissue evaluation (cycles I and II), MSU.

## АННОТАЦИЯ

Андроник Лариса, «Цитогенетика вирусного патогенеза у культурных растений»  
Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Кишинев, 2020

**Структура диссертации:** введение, 6 глав, общие выводы и рекомендации, список литературы из 490 наименований, 8 приложений, 209 страниц основного текста, 45 таблиц, 54 рисунка. Полученные результаты опубликованы в 74 научных работах.

**Область исследования:** Генетика растений

**Ключевые слова:** цитогенетика растений, вирусы, мейотическая и соматическая рекомбинация, белковые маркеры, микроспорогенез, вирусный патогенез, ультраструктура, генетическая изменчивость.

**Цель исследования:** выявление влияния вирусных агентов в качестве индукторов генетической изменчивости; установление цитогенетических эффектов у культурных растений на основе особенностей митотической и мейотической пролиферации в совместимых системах хозяин-патоген.

**Задачи:** выявление изменений в дифференцированных и активно делящихся клеточных системах у культурных растений (ячмень, томат, капуста), зараженных РНК или ДНК вирусами; установление особенностей мейотических и митотических делений; оценка влияния вирусных агентов на процессы мейотической и соматической рекомбинации в зависимости от особенностей систем хозяин-патоген; определение специфичности процессов клеточного деления у безвирусного потомства, полученного в условиях вирусного патогенеза; оценка генетической изменчивости у зараженных растений и потомства инфицированных растений; оценка генотоксичности вирусных агентов и установление механизмов индуцирования генетической изменчивости у растений-хозяев; разработка методов увеличения, оценки и отбора изменчивости на основе применения вирусов в качестве рекомбинационного фактора.

**Научная новизна и оригинальность работы:** аргументирована концепция генетических эффектов, вызываемых вирусными агентами у восприимчивых хозяев, подтверждающая возможность использования вирусов в качестве индукторов изменчивости, изменяющих внутреннюю структуру, транскрипцию и трансляцию, экспрессию генов и варьирование количественных признаков. Подтверждена сравнительная эффективность применения вирусов и гамма-лучей в изменении экспрессии генов, увеличении спектра рекомбинаций и расширении изменчивости наследуемой в потомстве инфицированных растений.

**Основные результаты для науки и практики:** Патогенез, вызванный ВАР, ХВБ, ВТМ, ВШМЯ и ВМЦК, приводит к структурным изменениям в инфицированных клетках (ассимиляционных, покровных тканей), а также в свободных от вирусных частиц (археспориальных и меристематических тканях), вызывая специфические и стереотипные реакции. На уровне тканей совместимых инфекционному процессу на вегетативных и репродуктивных органах и несовместимых с вирусными агентами (микроспорах) установлена дифференцированная клеточная чувствительность. Продемонстрировано влияние вирусов на конъюгацию хромосом, распределение генетического материала между дочерними клетками; установлено дестабилизирующее влияние на микроспорогенез у инфицированных генотипов томатов и ячменя, что обуславливает усиление асинхронизма и ускорение протекания мейотических стадий; установлены генотоксические и митогенные эффекты РНК-вирусов у хозяев и потомств инфицированных растений, включающие увеличение соматической рекомбинации; нарушения митотического деления, изменения экспрессии генов антиоксидантного метаболизма (АРХ и SOD) и белков связанных с патогенезом (PR-3, PR-5 и PR-10); доказан нуклеопатический эффект ДНК вируса, выраженный реконформациями хроматина.

**Теоретическая значимость работы:** реакция растений на вирусные инфекции на ультраструктурном уровне выражается специфическими реорганизациями, которые могут служить критерием идентификации возбудителя, и неспецифическими, основанные на принципах типичных преобразований, отражающие патогенность агента; продемонстрировано влияние вирусов у восприимчивых хозяев, обуславливающее широкий спектр реорганизаций, включающий асинхронное деление клеток и гетерогенность морфофункциональных и генетических изменений. Установлены специфические изменения экспрессии генов антиоксидантного метаболизма (АРХ и SOD), PR белков, в зависимости от патосистем, применяемые для идентификации генотипов с различной чувствительностью к вирусу.

**Прикладная значимость:** Разработанные методы увеличения генетической изменчивости у сельскохозяйственных культур (томаты, ячмень, капуста) с применением вирусной инфекции в качестве рекомбинационного фактора и оценка разнообразия на основе запасных белков (гордеина), и энзиматических (пероксидазы, эстеразы) и молекулярных (PR-5) маркеров.

**Внедрение научных результатов:** разработанные методы были применены для увеличения разнообразия генотипов, сочетающих ряд хозяйственно-ценных признаков и получения новых сортов томатов. Научные результаты послужили методическим пособием для курсов «Клеточная биология», «Гистология растений» и практических работ «Цитологические методы оценки клеток и тканей», МГУ.



**ANDRONIC LARISA**

**CITOGENETICA PROCESULUI DE PATOGENEZĂ VIRALĂ LA  
PLANTELE DE CULTURĂ**

**Specialitatea 162.01-Genetică vegetală**

Rezumatul tezei de doctor habilitat în științe biologice

---

Aprobat spre tipar: 11.12.2020  
Hârtie ofset. Tipar digital  
Coli de tipar: 3.00

Formatul hârtiei A4  
Tiraj 50 ex.  
Comanda nr. 50

---

Tipografia PRINT-CARO

str. Columna, 170

tel.: 022-85-33-86