

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII
INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A
PLANTELOR**

**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

TEZĂ de doctor habilitat în științe biologice

Consultant științific:

DUCA Maria, dr.hab., prof. univ., acad.

Autor:

ANDRONIC Larisa

Chișinău, 2020

© Andronic Larisa, 2020

CUPRINS

ADNOTARI (română, engleză, rusă).....	5
LISTA TABELELOR ȘI FIGURILOR	8
LISTA ABREVIERILOR.....	15
INTRODUCERE.....	16
 1. CITOGENETICA PATOGENEZEI VIRALE	31
1.1. Organizarea moleculară a fitovirusurilor și strategiile de expresie a genelor virale	31
1.2. Mecanisme de reacție a plantelor la infectare cu virusuri.....	37
1.3. Citopatologia celulelor vegetale infectate cu virusuri.....	45
1.4. Proliferarea celulară și factorii inductori ai diversității genetice.....	51
Concluzii la Capitolul 1	60
 2. CARACTERISTICA MATERIALULUI BIOLOGIC ȘI METODELOR DE CERCETARE	62
2.1. Materialul și metodologia cercetării	62
2.2. Metode virusologice de diagnostic și studiu al agenților virali.....	68
2.3. Metode de inducere și studiu a variabilității genetice.....	69
2.4. Metode citogenetice de studiu	71
2.5. Metode biochimice de studiu	75
2.6. Analiza expresiei genelor prin Real-Time PCR (qPCR)	76
2.7. Evaluarea caracterelor cantitative	78
2.8. Analiza statistică a datelor experimentale	79
Concluzii la Capitolul 2	80
 3. EXPRESII CITOPATOLOGICE ALE VIROZELOR LA PLANTELE DE CULTURA	81
3.1. Reacții citopatice induse de viroze la tomate	81
3.2. Aspecte ultrastructurale ale celulelor mezofilului la orzul infectat cu virusul mozaicului dungat al orzului.....	93
3.3. Citopatologia celulelor mezofilului la plantele de varză infectate cu virusul mozaicului conopidei.....	97
Concluzii la Capitolul 3.....	101
 4. MICROSPOROGENEZA LA TOMATE ȘI ORZ ÎN CONDIȚIILE PATOGENEZEI VIRALE	102
4.1. Studiul procesului de meioză la tomate în condiții de patogeneză virală.....	102
4.2. Evaluarea procesului de meioză la orzul de primăvară în condiții de patogeneză virală.....	110
4.3. Estimarea citogenetică a microsporoogenezei la plantele de tomate și orz în condiții de patogeneză virală	116
4.4. Regularitatea diviziunilor meiotice la tomate și orz în condiții de patogeneză virală.....	127
Concluzii la Capitolul 4.....	134

5. EVALUĂRI CITOGENETICE ALE PATOGENEZEI VIRALE LA PLANTELE INFECTATE ȘI LA DESCENDENȚII ACESTORA.....	135
5.1. Reacții defensive specifice și nespecifice ale tomatelor infectate cu virusuri și a descendenților acestora	135
5.2. Efectul mitogen și aneugen indus de virusul dungat al orzului la plantele gazdă....	143
5.3. Efectul clastogen cauzat de virusul mozaicului dungat al orzului la plantele gazdă.....	148
5.4. Expresia unor gene asociate stresului la orz și descendenții obținuți de la plante infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului.....	154
5.5. Efectul nucleopatic al virusului mozaicului conopidei în sisteme citopatice la nivelul structurilor calusale ale diferitelor soiuri de varză.....	161
Concluzii la Capitolul 5.....	165
6. MANIFESTAREA CARACTERELOR CANTITATIVE ȘI CALITATIVE LA PLANTELE INFECTATE CU VIRUSURI ȘI LA DESCENDENȚII ACESTORA.....	166
6.1. Variabilitatea caracterelor cantitative la tomate și descendenții plantelor infectate cu virusuri	166
6.2. Variabilitatea caracterelor cantitative la orz și descendenții plantelor supuse acțiunii infecției virale	174
6.3. Impactul virusului mozaicului conopidei în inducerea variabilității somaclonale la plantele gazdă.....	183
Concluzii la Capitolul 6.....	194
7. SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE	196
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI.....	207
BIBLIOGRAFIE.....	210
ANEXE.....	239
Anexa 1. Aspecte macrostructurale ale plantelor infectate cu virusuri.....	239
Anexa 2.Particularitățile suprafeței grăuncioarelor de polen de orz examinate la microscopul cu forță atomică.....	243
Anexa 3.Tipuri de bivalenți conform distribuției chiasmelor la tomate în condiții de patogeneză virală.....	245
Anexa 4. Aspectul citologic al microsporilor de tomate la diferite etape ale procesului de meioză.....	246
Anexa 5. Aspectul morfologic al sporadelor soiurilor de tomate infectate cu virusuri...	248
Anexa 6. Variații morfologice la descendenții plantelor de tomate infectate cu virusuri.	249
Anexa 7. Brevete de invenție.....	251
Anexa 8. Acte de implementare.....	276
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	278
CV-UL AUTORULUI	279

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, marcheri proteici, microsporogenează, 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 procedeele 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 recombinatii și extinderea variabilității genetice, reconformări ce pot fi transmise la descendenții plantelor infectate.

Rezultate principale 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 reconformări 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 restructurărilor 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 marcherilor 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 particularities 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 the 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 viral infections on ultrastructural level is expressed by specific reorganizations, which can serve as a criterion for the pathogen detection, and non-specific, manifested based on the principles of typical transformations, reflecting the pathogenicity of the viral agent; the impact of viral infections on susceptible hosts conditions 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 obtaining new varieties of tomatoes; 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 генетической 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. Продemonстрировано 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» (цикл I и II), МГУ.

LISTA TABELELOR ȘI FIGURILOR

Lista tabelelor

Tabelul 1.	Omologia și descrierea genelor asociate recombinării meiotice (după [372] cu completări)	53
Tabelul 2.1.	Sistemele gazdă-patogen antrenate în cercetare.....	62
Tabelul 2.2.	Compoziția de bază a mediilor nutritive pentru inducerea calusogenezei din fragmente de mezofil.....	70
Tabelul 2.3.	Sucesiunea primerilor pentru analiza PCR	78
Tabelul 3.	Răspunsuri specifice la infecțiile virale în dependență de particularitățile tisulare și intracelulare ale sistemelor gazdă-patogen.....	100
Tabelul 4.1.	Valoarea medie a numărului de chiasme per CMP la tomatele sănătoase și infectate cu virusuri	104
Tabelul 4.2.	Analiza varianței numărului de chiasme interstițiale la plantele de tomate sănătoase și infectate cu virusurile aspermiei tomatelor și X al cartofului....	105
Tabelul 4.3.	Frecvența tipurilor de bivalenți per CMP (n=12) la tomatele infectate cu VAT.	107
Tabelul 4.4.	Frecvența tipurilor de bivalenți per CMP la descendenții sănătoși ai tomatelor infectate cu VAT	108
Tabelul 4.5.	Frecvența tipurilor de bivalenți per CMP (2n=14) la soiurile de orz sănătoase și infectate cu VMDO	111
Tabelul 4.6.	Analiza varianței numărului de chiasme la plantele de orz sănătoase și infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului	112
Tabelul 4.7.	Valoarea medie a numărului de chiasme per CMP la descendenții de orz obținuți de la plante sănătoase și infectate cu VMDO	113
Tabelul 4.8.	Frecvența anomaliilor meiotice la tomate în cazul infectării cu VAT, %	117
Tabelul 4.9.	Frecvența celulelor mamă polinice cu aberații în cazul iradierii tomatelor sănătoase și infectate cu virusuri	119
Tabelul 4.10.	Frecvența celulelor cu aberații și spectrul anomaliilor meiotice în A-T I în cazul iradierii tomatelor sănătoase și infectate cu virusuri	120
Tabelul 4.11.	Analiza varianței frecvenței anomaliilor meiotice la tomatele infectate și supuse iradierii	121
Tabelul 4.12.	Frecvența celulelor mamă polinice cu aberații la descendenții tomatelor infectate	122
Tabelul 4.13.	Rata celulelor normale și spectrul anomaliilor meiotice în A-T I la descendenții tomatelor infectate	122
Tabelul 4.14.	Frecvența CMP cu aberații la plantele de orz sănătoase și infectate cu VMDO	124
Tabelul 4.15.	Procentul celulelor normale și spectrul anomaliilor meiotice în A-T I la descendenții soiurilor de orz infectate cu VMDO	126
Tabelul 4.16.	Analiza varianței frecvenței anomaliilor meiotice la descendenții de orz obținuți de la plante infectate	126
Tabelul 4.17.	Frecvența sporadelor anormale la soiurile de tomate și orz de primăvară, sănătoase și infectate cu virusuri	129
Tabelul 4.18.	Procentul CMP la diferite etape ale diviziunii meiotice la plantele de tomate sănătoase și infectate cu virusuri.....	132
Tabelul 4.19.	Frecvența CMP în dependență de fazele diviziunii meiotice la plantele de orz de primăvară sănătoase și infectate cu VMDO	133

Tabelul 5.1.	Activitatea peroxidazei și polifenoloxidazei în extractele vegetale ale genotipurilor de plantelor infectate cu virusuri și descendenții acestora	138
Tabelul 5.2.	Frecvența micronucleilor în radiculele de orz în cazul infectării cu virusul mozaicului dungat al orzului pe fondalul razelor gama	145
Tabelul 5.3.	Frecvența schimburilor între cromatidele surori induse de virusul mozaicului dungat al orzului în celulele meristemale ale radiculelor la plantele de orz sănătoase și iradiate (per celulă)	150
Tabelul 5.4.	Analiza varianței frecvenței SCS la plantele de orz sănătoase și infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului	153
Tabelul 5.5.	Activitatea transcripțională (unități convenționale) a unor gene a metabolismului antioxidant și defensiv în frunzulițele plantelor de orz sănătoase și infectate cu VMDO	155
Tabelul 5.6.	Activitatea transcripțională a unor gene a metabolismului antioxidant și defensiv în frunzulițele descendenților plantelor de orz infectate cu VMDO ...	158
Tabelul 5.7.	Schimbările morfometrice ale structurilor nucleare în condiții <i>in vitro</i> a celulelor de varză albă infectate cu virusul mozaicului conopidei	163
Tabelul 6.1.	Valoarea caracterelor cantitative la plantele de tomate sănătoase și infectate cu VAT	167
Tabelul 6.2.	Valoarea indicilor biochimici ai fructelor de tomate la plantele infectate cu VAT	168
Tabelul 6.3.	Nivelul valoric al caracterelor cantitative la descendenții plantelor de tomate infectate cu VAT	170
Tabelul 6.4.	Coeficientul de variație (%) a unor caractere cantitative la descendenții soirilor de tomate infectate cu VAT	171
Tabelul 6.5.	Analiza varianței pentru capacitatea de calusogeneză la unele soiuri de varză..	185
Tabelul 6.6.	Influența virusului mozaicului conopidei asupra capacității de calusogeneză a diferitelor zone citopatice la unele soiuri de varză	186
Tabelul 6.7.	Analiza varianței pentru capacitatea de calusogeneză la unele soiuri de varză în dependență de zona citopatică	186
Tabelul 6.8.	Frecvența calusogenezei și regenerării <i>in vitro</i> la unele soiuri de varză infectate cu virusul mozaicului conopidei	187
Tabelul 6.9.	Analiza varianței pentru capacitatea de calusogeneză și regenerare la unele soiuri de varză	188
Tabelul 6.10.	Valoarea unor caractere morfologice la regeneranții de varză obținuți prin culturi <i>in vitro</i>	192
Tabelul 6.11.	Coeficientul de variație a unor caractere cantitative la regeneranții de varză obținuți din histopatosisteme ale mezofilului	193
Tabelul 6.12.	Analiza varianței pentru unele caractere morfologice studiate la regeneranții de varză albă obținuți prin tehnici <i>in vitro</i>	193
Tabelul 7.1.	Reorganizări intracelulare induse de infecțiile virale în dependență de specificul tisular al sistemului gazdă-patogen	199
Tabelul 7.2.	Modificări meiotice sub influența infecțiilor virale la plantele gazdă și descendenții plantelor infectate	205

Lista figurilor

Figura 1.1.	Reprezentarea schematică a hărții genomice și transcrierii produșilor la virusurile ADN (A – <i>Caulimoviridae</i> , B – <i>Badnaviridae</i>) (după [351])	34
Figura 1.2.	Reprezentarea schematică a integrării genomului viral VDB (tulpina BSGfV) în genomul <i>Musa balbisiana</i> (după [151]).....	36
Figura 1.3.	Schema de încorporare a BrdU cu formare de SCS pe parcursul a trei diviziuni celulare succesive (după [353]).....	58
Figura 2.1.	Schema metodologică a cercetărilor (originală)	63
Figura 2.2.	Reprezentarea diferitelor tipuri de bivalenți la tomate (<i>S. lycopersicum</i> L.): A) bivalent cu o chiasmă interstițială; B) bivalent cu două chiasme interstițiale; C) bivalent cu o chiasmă terminală; D) bivalent cu o chiasmă terminală și una interstițială; E) bivalent cu o chiasmă terminală și două interstițiale; F) bivalent cu două chiasme terminale; G) bivalent cu două chiasme terminale și una interstițială; H) univalenți (x 1500).	73
Figura 2.3.	Reprezentarea diferitelor tipuri de bivalenți la orz (<i>H. vulgare</i> 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).....	73
Figura 2.4.	Cromozomi metafazici la <i>H. vulgare</i> : 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)	74
Figura 3.1.	Acumulări intracelulare ale VMT în celulele mezofilului la soiul Elvira (A) și stratului tapetal la <i>S.pimpinellifolium</i> (B) (scara barei 0,6 μm).....	82
Figura 3.2.	Aspecte ultrastructurale ale celulelor tomatelor infectate cu VAT: structuri veziculare tapetate cu particule virale în citoplasma celulelor mezofilului la s. Fachel (A) și s. Elvira (B), particule dispersate solitar în citoplasma celulelor sepalelor la <i>S. racemigerum</i> (C); acumulări intraplastidiene ale VAT în sepale la s. Prizior (D); incluziuni cristaloide citoplasmatiche în endoteciu la s. Elvira..	83
Figura 3.3.	Aspecte ultrastructurale ale celulelor tomatelor infectate cu VXC: structuri membranare în citoplasma celulelor mezofilului la s. Fachel (A), <i>S. pimpinellifolium</i> (B) și celulele sepalelor la s. Elvira (C), particule virale în citoplasma celulelor floemului la <i>S. racemigerum</i> (D) (scara barei 0,75 μm).....	84
Figura 3.4.	Aspectul ultrastructural în patosistemele create de VMT și genotipurile de tomate: celulele mezofilului la s.Fachel (A), s. Elvira (B), <i>S. pimpinellifolium</i> (C) și celulele endoteciei s. Fachel (D), s. Elvira (E), <i>S. pimpinellifolium</i> (F).....	86

Figura 3.5.	Ultrastructura celulelor mezofilului plantelor infectate cu VAT (A-C) și VXC (D-F), genotipurile: s. Elvira (A, B, C), <i>S. racemigerum</i> (D, E, F).....	88
Figura 3.6.	Particularități ultrastructurale ale celulelor genotipurilor de tomate infectate cu virusuri: structuri membranare în celulele mezofilului s. Elvira infectat cu VAT (A) sau VMT (B), fragmente ale celulelor endoteciului formeii spontane <i>S. racemigerum</i> , infectate cu VAT (C) (scara barei 0,7 μm).....	90
Figura 3.7.	Ultrastructura grăuncioarelor de polen de tomate formate în condiții de patogeneză virală: polen al plantelor sănătoase (A); grăuncioare de polen cu structură normală (B) și modificări de diferit grad în anterele plantelor infectate cu VAT (C, D), VXC (E, G) și VMT (F, H); grăuncioare de polen lipsite de conținut intern (I) (scara barei 1,2 μm).....	91
Figura 3.8.	Ultrastructura celulelor mezofilului (A, B) și endoteciului (C, D) la soiurile de orz infectate cu VMDO: A, C – s. Galactic, B, D – s. Sonor (scara barei 0,7 μm)	94
Figura 3.9.	Ultrastructura grăuncioarelor de polen la soiul de orz de primăvară Galactic: A – plante sănătoase, B – infectate cu VMDO (scara barei 0,75 μm).	96
Figura 3.10.	Ultrastructura celulelor mezofilului plantelor infectate cu VMC: soiul de varză s. Amagher (A, C) și conopidă, s. Zavadovschii (B, D) (scara barei 0,6 μm).....	98
Figura 4.1.	Aspectul meiocitelor de tomate (I - s. Fachel, lotul martor, II – s. Fachel infectat cu VAT și III – varietatea <i>L. racemigerum</i> , infectat cu VAT) la diferite etape ale profazei I meiotice: a) zigoten; b) pachiten; c) diachineză timpurie; d) diachineză târzie (x 600).....	103
Figura 4.2.	Distribuția tipurilor de bivalenți la genotipurile analizate ale plantelor sănătoase (A) și virus infectate (B).....	106
Figura 4.3.	Distribuția tipurilor de bivalenți la descendenții plantelor martor (A) și plantelor infectate cu VAT (B).....	109
Figura 4.4.	Aspecte citologice ale meiocitelor de orz la diferite etape ale profazei I meiotice: leptoten la plantele sănătoase (A – D), zigoten/pachiten (E – H), diploten (I – L) și diachineza târzie (M – P) la plantele sănătoase ale soiurilor Galactic (A, E, I, M), Sonor (B, F, J), Unirea (N) și infectate cu VMDO, soiurile Galactic (C, P), Sonor (G, O), Unirea (L, P, D, H) (x 600)	110
Figura 4.5.	Dendrograma distribuției diferitelor tipuri de bivalenți în meiocitele de orz a descendenților plantelor infectate și sănătoase a soiurilor Galactic (A, B), Sonor (C, D), Unirea (E, F). Varianta martor – A, C, E; descendenții plantelor virozate – B, D, E	114
Figura 4.6.	Diviziuni meiotice la orz la diferite etape ale etapelor meiotice: A) metafază I normală; B) metafaza I cu o eliminare de cromozomi (săgeată); C) metafaza I cu cromozomi precoci (săgeata); D) anafaza I normală; E) anafaza I cu cromozomi precoci și retardatari; F) telofaza I cu cromozomi retardatari (săgeata); G) telofaza I normală; H) și I) telofaza I cu punți cromozomale (săgeata); J) telofaza II normală (săgeata); K) telofaza II cu retardări (săgeata); L) segregarea neechivalentă a cromatidelor (săgeată) (x 600).....	125
Figura 4.7.	Celule cu distribuții neechivalente ale cromozomilor la plantele de tomate sănătoase și infectate cu VAT, %.....	128

Figura 4.8.	Rezultatul microsporogenezei la soiurile de tomate și orz: A) tetrade normale la s. Fachel; B) tetrade cu microspori neechivalenți (indicați cu săgeți) 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).....	130
Figura 4.9.	Celule microsporale în anterele de tomate (A, B) și orz (C, D): A) CMP la etapa de leptoten în anterele plantelor martor, s. Fachel, lungimea anterei 2 mm; B) microspori la etapa de tetrade în anterele plantelor infectate cu VAT, lungimea anterei 2 mm; C) meiocite la etapa de leptoten în anterele plantelor martor, s. Galactic; B) microspori la etapa de tetrade în anterele plantelor infectate cu VMDO (x 400).....	132
Figura 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 ² /Tm-2 ²) (E-H), s. Elvira (I-L), <i>S. pimpinellifolium</i> (M-P) în variantele martor (A,E,I,M) și a plantelor infectate cu VMT (B, F, J, N) și VAT (C, D, G, H, K, L, O, P) (scara barei 0,8 μm)....	136
Figura 5.2.	Activitatea peroxidazei la genotipurile de tomate cu diferită reacție la infecțiile virale	139
Figura 5.3.	Activitatea polifenoloxidazei la genotipurile de tomate cu diferită reacție la infecțiile virale.....	140
Figura 5.4.	Localizarea histochimică a α-tomatinei în țesuturile pețiolilor plantelor de tomate sănătoase (A, D, H, K) și infectate cu VAT (B, E, I, L) sau VMT (C, F, J, M). Secțiuni transversale la genotipurile: A-C – <i>S. pimpinellifolium</i> , D-F – s. Elvira, H-J – s. Craigella (Tm-1/Tm-1), K-M – s. Craigella (Tm-2 ² /Tm-2 ²) (x 150).....	142
Figura 5.5.	Indicele mitotic (%) în radiculele de orz ale semințelor obținute de la plante infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului și/sau iradiate cu raze gama.	144
Figura 5.6.	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).....	146
Figura 5.7.	C-metafaze în radiculele de orz, soiul Unirea: A) infectat cu virusul mozaicului dungat al orzului; B) iradiat cu raze gama (150 Gy) și infectat cu virusul mozaicului dungat al orzului (x 600).....	147
Figura 5.8.	Mutații clorofilene la plantulele s. Unirea A) infecție virală; B) infecție virală în complex cu raze gama 150 Gy.....	147
Figura 5.9.	Nivelul schimburilor între cromatidele surori induse de virusul mozaicului dungat al orzului și razele gama la plantele de <i>H. vulgare</i> (per cromozom)....	151
Figura 5.10.	Aspectul unor plăci metafazice în celule meristemelor radiculare la <i>H.vulgare</i> , soiul Unirea: A) martor, B) virusul dungat al orzului, C) 150 Gy, D) 150 Gy + virus	152
Figura 5.11.	Profilurile de amplificare a produselor primerilor pentru genele: α-tubulina (A), SOD (B), APX (C), PR-3 (D), PR-5 (E), PR-10 (F) la plantele variantei martor (1, 11, 20) infectate (2, 12, 21) a soiurilor Galactic (I), Sonor (II), Unirea (III)	156

Figura 5.12.	Profilurile de amplificare a produselor primerilor pentru genele: α -tubulina (A), SOD (B), APX (C), PR-3 (D), PR-5 (E), PR-10 (F) la varianta martor (7, 17, 22) și descendenții plantelor infectate (8, 18, 23) a soiurilor Sonor (7, 8), Galactic (17, 18) și Unirea (22, 23).....	159
Figura 5.13.	Activitatea transcripțională (unități convenționale) a genelor asociate cu stresul în frunzulițele plantelor de orz sănătoase, infectate cu VMDO și descendenții acestora	160
Figura 5.14.	Aspectul ultrastructural al celulelor calusale cu capacitate proliferativă, derivate din țesuturi mezofilului la soiurile de varză infectate cu VMCo. A – morfologia nucleului interfazic în calusul variantei martor a s. Haricovscaia. B – aspectul unui fragment al celulei calusale derivate de la s. Haricovscaia infectat cu VMCo; C – ultrastructura nucleului interfazic în calusul obținut din mezofilul plantelor s. Iuniscaia infectate cu VMCo; D – fragmente de celule în calusurile proliferative ale s. Moldavanca, varianta martor; E, F – morfologia structurilor nucleare și a organitelor celulare în calusurile morfogene ale s. Moldavanca infectat cu VMCo (scara barei 0,8 μ m)	162
Figura 6.1.	Indicii biochimici ai fructelor de tomate obținute de la descendenții plantelor infectate cu VAT a soiurilor Nistru (N), Prizior (Pr) și Fachel (F): A – conținutul substanțelor uscate, %; B – zahar total, %; C – aciditatea totală, %	171
Figura 6.2.	Electroforegramele produșilor de amplificare ale ADN-ului genomic al descendenților de tomate obținuți de la plante infectate cu virusuri: A – s. Craigella (Tm-2 ² /Tm-2 ²), B – s. Craigella (Tm-1/Tm-1), C – s. Elvira, D – sp. <i>S. pimpinellifolium</i> . Rezultatele amplificării cu ajutorul primerilor iPBS: I – 17pb, II – 20 pb.....	173
Figura 6.3.	Electroforegrama hordeinelor în cariopsele de orz ale soiurilor: Galactic (A), Sonor (B), Unirea (C), conform variantelor: 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.....	177
Figura 6.4.	Electroforegrama hordeinelor în cariopsele de orz la soiurile: Galactic (A), Sonor (B), Unirea (C), conform variantelor: 1 – martor; descendenții variantelor: 2 – 100 Gy; 3 – 150 Gy; 4 – 250 Gy; 5 – virus; 6 – 100 Gy+virus; 7 – 150 Gy+virus; 8 – 250 Gy+virus	180
Figura 6.5.	Electroforegrama peroxidazelor în frunzulițele plantulelor de orz de primăvară a soiurilor Galactic (A), Sonor (B) și Unirea (C) conform variantelor experimentale: 1 – martor, 2 – virus, 3 – 100, 4 – virus+100Gy, 5 -150Gy, 6 – virus+150Gy.....	181
Figura 6.6.	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.....	182
Figura 6.7.	Capacitatea regenerativă și regeneranți de varză obținuți din diferite sisteme citopatice a soiurilor Haricovscaia (A, B, C) și Podaroc (D, E, F): A, D – țesuturi nemodificate macro-structural, B, C – țesuturi malformate, C, F – țesuturi adiacente malformațiilor.....	185

Figura 6.8.	Spectrul peroxidazelor în explantele de diferită origine a soiurilor de varză: Haricovscaia (1, 2, 3), Podaroc (4, 5, 6) și conopidă (7, 8, 9): 1, 4, 7 – martor, 2, 5, 8 – calus regenerativ din țesuturi malformate și adiacente malformațiilor (3, 6, 9)	190
Figura 6.9.	Distribuirea frunzulițelor s. Haricovscaia după lățime și lungime la regeneranții martor și cei derivați din explante infectate cu virus (Col 1, 10 – martor, Col 5, 12 – virus; Col 1, 5 – lățimea, Col 10, 12 – lungimea unei frunzulițe)	191
Figura 6.10.	Coraportul lățime/lungime a frunzulițelor somaclonelor de varză: 1 – martor, 2 – virus	192
Figura 6.11	Variația lungimii rădăcinii principale la regeneranții obținuți <i>in vitro</i> : 1 – martor, 2 – virus.....	192
Figura 7.1.	Schema replicării ARN-ului viral de tip (+) (originală)	197
Figura 7.2.	Structuri specifice induse de infecțiile virale în sistemele virus-gazdă analizate	200
Figura 7.3.	Răspunsul antiviral în sistemele compatibile virus-gazdă (originală)	202

LISTA ABREVIERILOR

- APX** – ascorbat peroxidaza (ascorbate peroxidase, APX)
- ARNdc** – ARN dublu catenar (double-stranded RNA, dsRNA)
- ARNi** – ARN de interferență (RNA interference, iRNA)
- ARNsi** – ARN mici de interferență (shot interfering RNA, siRNA)
- CMP** – celulă mama polinică (pollen mother cell, PMC)
- PA** – Proteina capsidei sau proteină de acoperire (capsid protein, CP)
- PD** – Proteină de deplasare (movement protein, MP)
- POX** – peroxidaza (peroxidase, POX)
- PPO** – polifenoloxidaza (polyphenol oxidase, PPO)
- PR** – proteine asociate patogenezei (pathogenesis-related proteins, PR)
- RE** – rezistență extremă (extrem resistance, ER)
- RH** – răspuns hipersensibil (hypersensitive response, HR)
- RII** – răspunsul de imunitate indusă (plant triggered immunity, PTI)
- RNG** – rezistență non-gazdă (non-host resistance, NHR)
- RSD** – rezistența sistemică dobândită (systemic acquired resistance, SAR)
- SCS** – schimburi între cromatidele surori (sister chromatid exchange, SCE)
- SOD** – superoxide dismutaza (superoxide dismutase, SOD)
- SPU** – sistemul proteasomic ubicuitar (ubiquitin proteasome system, UPS)
- SRO** – specii reactive de oxygen (reactive oxygen species, ROS)
- VAT** – virusul aspemiei tomatelor (tomato aspermy virus, TAV)
- VMCo** – virusul mozaicului conopidei (cauliflower mosaic virus, CaMV)
- VMDO** – virusul mozaicului dungat al orzului (barley stripe mosaic virus, BSMV)
- VMT** – virusul mozaicului tutunului (tobacco mosaic virus, TMV)
- VXC** – virusul X al cartofului (potato virus X, PVX)
- VYC** – virusul Y al cartofului (potato virus Y, PVY)

INTRODUCERE

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 procedeeelor 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. [27].

Programele de ameliorare orientate pe crearea de soiuri performante necesită atragerea de noi surse de germoplasma, 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 [279]. Tradițional în ameliorare, în calitate de procedee de obținere și majorare a variabilității, se aplică hibridarea sau mutageniza experimentală. În calitate de inductori ce pot depăși aceste bariere, complementar culturilor *in vitro* [16], conform rezultatelor cercetărilor noastre sunt folosite virusurile fitopatogene [11; 15; 45], sau îmbinarea factorilor mutageni [140].

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.

În dependență de reacția față de virusuri, plantele pot prezenta rezistență sau sensibilitate (toleranță, susceptibilitate). Pentru majoritatea culturilor este dificil de a identifica genele de rezistență din motivul specificității înalte către fiecare tulpină virală, caracterul oligo- sau poligenic al moștenirii, precum și recesivitatea multora dintre acestea. Specificitatea reacției plantei este determinată de cooperarea factorilor necesari pentru replicarea și distribuirea virionilor cu factorii defensivi ai plantei gazdă. Complexitatea procesului de patogenitate demonstrează că procesele metabolice de apărare împotriva infecțiilor virale sunt majore și diverse ca formă.

În pofida progreselor realizate în cunoașterea bazelor moleculare ale 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 [198]. 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. Fitovirusurile sunt responsabile nu doar de pierderile cantitative, ci și de compromiterea însușirilor calitative. Infecțiile virale generează la plantele infectate un șir de simptome condiționate de mai multe elemente, principalele dintre care sunt reacția stabilită între genotipul gazdei și a virusului (susceptibilitate, toleranță, rezistență), factorii de mediu. Fiind paraziți obligatori, virusurile sunt în deplină dependență plastică și energetică de celulele vii infectate. Este cunoscut faptul, că doar pătrunderea particulelor virale prezintă semnale care induc reacții de răspuns ce au la bază un șir de procese metabolice [331]. Multiplicarea și distribuirea agentului patogen prin organele plantei generează diverse reorganizări structurale exteriorizate macroscopic prin simptome secundare, iar relațiile trofice între patogen și celulă pot fi limitate la nivelul unor țesuturi (cum sunt infecțiile floemice) sau se pot extinde prin întreg organismul (infecțiile sistemice).

Ca urmare a conexiunilor dintre virusuri și componentele celulare se produc modificări în biosinteza compușilor organici, respirație, fotosinteză, sinteza hormonilor și compușilor de semnalizare [106]. Totodată se înregistrează și modificări specifice generate de infecțiile virale. Este demonstrat, că acidul nucleic viral cauzează stabilirea reacțiilor specifice prin generarea sintezei unor molecule cum sunt ARN_{dc}, ARN_{si}, ARN_i [331].

Fitovirusurile, drept patogeni moleculari [229], sunt considerați paraziți la nivel genetic. Replicarea acidului nucleic viral și a componentelor virali este realizată prin cooperarea genomului viral și al plantei gazdă, care în majoritatea cazurilor este asociată cu procesele de inhibare a expresiei genelor proprii ale gazdei, blocarea transportului nucleoplasmatic, sintezei proteinelor proprii ale celulei gazdă, precum și perturbarea transportului vezicular intracelular. Totodată este stabilit, că reorganizările structurale și funcționale cuprind nu doar celulele infectate, dar și cele învecinate și lipsite de germeni virali.

Conform datelor din literatura de specialitate, interacțiunile factorilor patogeni și celulari pot provoca instabilitatea genomului și rearanjamente structurale ale ADN-ului organismului gazdă [281; 308], paramutații [71], perturbări ale recombinării între cromozomii omologi [240; 272; 306], modificări ale expresiei genelor [235].

Studiile recente indică că interacțiunile dintre plante și agenții patogeni se bazează pe mecanisme epigenetice [113; 222; 345], iar infectarea unei gazde sensibile cu un virus compatibil rezultă cu activarea semnalelor cum ar fi inducerea ARNsi [73]. Aceste semnale se extind sistemic de la locul de infectare spre țesuturile neinfectate, inclusiv țesuturile organelor generative. Infectarea este însoțită de hipo- sau hipermetilarea genelor specifice, modificări de natură epigenetică ce pot fi transmise descendenților. La baza acestor perturbări stau efecte genetice (mutații punctiforme și recombinarea genică) care conduc la formarea de noi combinații alelice, ce ulterior pot fi moștenite. Ca rezultat al mutațiilor sau epimutațiilor, gameții formați și indivizii rezultați dețin noi combinații alelice.

Se consideră, că virusurile sunt capabile să infecteze celulele care se divid activ, iar în situația în care acest lucru nu se produce, virusurile dezvoltă mecanisme pentru modificarea ciclului celular al gazdelor. Este stabilit, că proteinele *Rep* ale geminivirusurilor interacționează cu proteina pRBR (cunoscută ca proteină asociată retinoblastomului), care este implicată în reglarea negativă a ciclului celular [132]. Lukens L. și Zhan S. [274] concluzionează, că factorii ce produc modificări în reproducerea celulară pot induce o variabilitate genetică și, respectiv afecta spectrul următoarelor generații. Pe exemplul baculovirusurilor este demonstrat rolul patogenilor microbieni în dinamica populațiilor gazdelor [417].

Privitor la influența infecțiilor virale asupra proceselor proliferative, în literatura de specialitate informațiile sunt limitate. Conform unor autori, virusul mozaicului dungat al orzului cauzează la porumb activarea elementelor transpozabile, precum și mutații la descendenții neinfecțați [308]. Autorii sugerează ideea, că inducerea de către virusul piticirii rugoase a porumbului a unui efect moștenit poate fi rezultatul influenței infecției virale asupra stabilității genomului gazdei. Se consideră, că acest rezultat ar putea fi generat și de către răspunsul sistemic al plantei față de patogen. Molinier et al. [306] și Takeda, Paszkowski, [398] explică modificările induse de factorii de stres printr-un mecanism conform căruia plantele răspund la factorii exogeni prin reacții genetice și epigenetice.

Având drept reper efectele genetice, au fost fundamentate studiile ce țin de utilizarea fitovirusurilor în calitate de inductori ai variabilității genetice la plantele de cultură. Această strategie de sporire a frecvenței și spectrului de recombinanți merită o atenție deosebită deoarece asigură antrenarea în procesul de ameliorare a unor noi surse de rezistență față de factori de mediu și contribuie la sporirea eficienței selecției genotipurilor valoroase în baza productivității și calității.

Orice infecție virală este complementată de reacții nespecifice și specifice, acestea din urmă reflectând polivalența maladiilor virale și necesitatea studiului individualizat al patosistemelor. Răspunsurile plantelor se bazează pe capacitatea de a recunoaște stresul indus de infecția virală și cele asociate cu producerea semnalelor care pot activa reacții specifice în celulele infectate și țesuturile îndepărtate.

Interesul pentru anumiți patogeni este determinat nu doar de efectul păgubitor asupra culturilor, dar și de multiplele efecte provocate. Conform datelor din literatură virusul mozaicului tutunului, virusul mozaicului castraveților (membru al aceleiași clase cu virusul aspermiei tomatelor), virusul X al cartofului, virusul mozaicului conopidei, virusurile orzului sunt în topul primilor 10 patogeni după impactul molecular cauzat [369]. În acest context, în calitate de gazde susceptibile (care dezvoltă infecții productive) prezintă interes genotipurile de tomate, orz de primăvară, speciile de crucifere (varză), precum și virusurile cu impact economic – virusul mozaicului tutunului (VMT), virusul aspermiei tomatelor (VAT), virusul X al cartofului (VXC), virusul mozaicului dungat al orzului (VMDO), virusul mozaicului conopidei (VMCo), deosebite prin acidul nucleic deținut (ARN sau ADN), strategiile de replicare, precum și morfologia particulelor virale (liniare, sferice sau filamentose).

Pentru înțelegerea mecanismului de interacțiune gazdă-patogen, este importantă cunoașterea bazei genetico-moleculare a rezistenței și elementelor reacțiilor de răspuns (gene, familii de gene, markerilor moleculari) în vederea descrierii genotipurilor de interes în programe de ameliorare [20].

Cercetările cu privire la identificarea și dezvoltarea conceptelor patogenezei virale dovedesc complexitatea acestui proces. Este de remarcat faptul că studiile care au contribuit la progresul acestor evaluări au fost executate pe un număr limitat de patosisteme, dovedind importanța dezvăluirii 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 selectare a genotipurilor recombinante cu caractere utile în baza aplicării infecției virale în calitate de factor recombinogen.

Ipoteza de cercetare. Având drept reper modificările genetice mediate în dezvoltarea infecției, este argumentată ipoteza conform căreia restructurările nucleopatice generate de infecția virală pot induce în generațiile ulterioare modificări genetice, cauzând variația diferențiată a caracterelor.

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 virale fără capacitatea de transmitere verticală (prin polen sau ovule). În scopul evidențierii particularităților structurale și funcționale generate de infecțiile virale, la plantele infectate și descendenții lor au fost utilizate specii autogame (tomate, orz și varză) care au manifestat sensibilitate (susceptibilitate sau toleranță) la agenți virali ADN sau

ARN. Cercetările structurale au fost realizate la nivelul țesuturilor și celulelor compatibile procesului infecțios (organe vegetative și reproductive), celulelor necompatibile pentru germenii virali (microspori) la plantele de tomate și orz infectate cu diferite virusuri ARN. Impactul infecțiilor virale (ARN și ADN) asupra proceselor proliferative a fost stabilit la nivelul țesuturilor generatoare (celule ale meristemelor radiculare, celule 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 fizic cu mecanis de acțiune asupra sistemelor biologice (celule, țesuturi, organism) cunoscut.

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 [187], metoda imunoenzimatică [96] și imunosorbentă [295]. Pentru **inducerea variabilității genetice** au fost aplicate metoda culturii *in vitro* [312] și de mutageneză experimentală. Regularitatea **diviziunilor mitotice și meiotice**, inclusiv **recombinarea meiotică și somatică** au fost evaluate conform [203; 333; 480]. Pentru aprecierea impactului infecțiilor virale asupra plantelor gazdă au fost utilizate **metode biochimice de studiu** (polimorfismului peroxidazelor și esterazelor [397], proteinelor de rezervă [379]). Conținutul substanțelor uscate în fructe, frunze a fost determinat prin metoda uscării în etuvă conform [462]. Aprecierea caracterelor cantitative a fost realizată cu ajutorul **metodelor biometrice** conform ghidurilor UPOV aprobate pentru fiecare cultură. Evaluarea nivelului de expresie a unor gene asociate patogenezei și potențialului oxidativ a fost realizată prin tehnica **PCR cantitativ**, iar **concentrația relativă a transcriptilor** genelor analizate față de gena de referință a fost calculată după Livak K. și Schmittgen T. [268]. Pentru aprecierea rolului genotipului, virusului, interacțiunii acestora în sursa de variație a caracterelor cantitative a fost aplicată analiza bi- și trifactorială a **varianței ANOVA** [99]. Gradul de similitudine a genotipurilor a fost stabilit în baza analizei clusteriene prin metoda construirii dendrogramelor. **Prelucrarea statistică** a datelor s-a efectuat cu ajutorul pachetelor de programe Statgraphics Plus 2.1, Statistica 7.0.

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute se caracterizează prin 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, inclusiv expresia genelor și proteinelor, 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 procesului de patogeneză virală au fost stabilite complementar reorganizărilor structurale, efecte genetice, exprimate prin abateri ale proceselor de recombinare somatică, meiotică, perturbări ale proceselor proliferative, modificări ale gradului de expresie a genelor asociate patogenezei la gazde și descendenții obținuți în condiții de patogeneză, rezultate ce au permis evidențierea reacțiilor specifice și markerilor proteici asociați cu patogeneza virală ce oferă date noi despre particularitățile mecanismelor de susceptibilitate și rezistență ale plantele de cultură la agenții virali.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere: 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 organelor celulare poartă caracter stereotipic, manifestând eterogenitate în gradul de expresie în cadrul unei celule, precum și între celulele aceluiași țesut.

Analiza citologică a microsporogenezei a evidențiat majorarea frecvenței **aberațiilor meiotice** la soiurile de tomate analizate în cazul infectării cu VAT, VXC, precum și în cazul soiurilor de orz și VMDO. La plantele infectate s-a constatat o creștere semnificativă a numărului de aberații cromozomale de tipul eliminărilor de cromozomi, cromozomi retardatari, 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 concret virus-plantă, fiind influențată de genotipul gazdei în proporție de cca 50%, iar puterea de acțiune a infecției virale variază între $18 \div 36\%$, în dependență de agentul viral

aflat în studiu. Sistemele gazdă-patogen reacționează specific în cazul fiecărui genotip analizat în ce privește cota aberațiilor în microsporogeneză. Tipurile aberațiilor cromozomiale constatate sunt similare celor produse de acțiunea radiației gama.

A fost demonstrată influența infecțiilor virale asupra inducerii mutațiilor meiotice, modificări ale fenomenelor de **recombinare mitotică** și **meiotică**. 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. Această redistribuire are o mare semnificație, deoarece conduce la sporirea recombinării genelor localizate în același grup de *linkage* și generează 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, exprimată prin majorarea frecvenței de schimburi cromatidice în celulele proliferative ale plantelor gazdă. Infecția produsă de VMDO a cauzat inducerea de anomalii ce au la bază dereglări ale fusului de diviziune, așa cum ar fi C-mitozele, ceea ce denotă **caracterul aneugen al agentului patogen** 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** (asociat replicării și localizării virionilor virali), ce pot servi criteriu pentru detectarea patogenului, și **nespecific**, manifestat în baza principiilor restructurărilor tipice descrise pentru condiții de senescență, factori abiotici, ce reflectă patogenitatea agentului viral.

Prin cercetările expuse se demonstrează 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 morfofuncționale 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 [10; 13]. 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 cantitative și calitative [23; 49]. În baza acestor rezultate a fost demonstrată posibilitatea majorării și dirijării variabilității genetice în dependență de particularitățile sistemului gazdă-patogen. În această direcție au fost elaborate procedee de extindere a variabilității genetice prin utilizarea infecțiilor virale solitare sau în asociere cu razele gama / cultura *in vitro* la diferite plante de cultură (tomate, orz de primăvară, varză) și elucidate particularitățile proliferării celulare, inducerii recombinării somatice sau meiotice [6; 10; 13].

Postulatele 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 în celulele infectate (țesuturi asimilatoare, de protecție), dar și în cele lipsite de germeni 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 aplicarea infecției virale ca factor recombinogen și aprecierea diversității în baza markerilor 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 a fost demonstrată posibilitatea majorării și dirijării variabilității genetice în dependență de particularitățile sistemului gazdă-patogen. În această direcție au fost **elaborate procedee de extindere a variabilității genetice** prin utilizarea infecțiilor virale solitare sau în asociere cu razele gama / cultura *in vitro*, procedee de obținere a recombinanților pentru diferite plante de cultură (tomate, orz, varză) și elucidate particularitățile proliferării celulare, inducerii recombinării somatice sau meiotice [6; 10; 13]. Astfel, ca rezultat al infectării tomatelor la etapa de microsporogeneză, a fost obținută majorarea frecvenței și spectrului recombinărilor meiotice, modificarea coeficientului de variație a numărului de fructe per ciorchină de 2,7 ori, masei unui fruct de 3,8 ori, numărului de semințe per fruct de 4,9 ori, precum și diversificarea spectrului de forme noi ce îmbină diferite caractere cantitative agronomice valoroase. Prin acest procedeu au fost obținute noi genotipuri în baza soiului Fachel, cu masă mare a fructului, conținut sporit de substanțe uscate și număr redus de semințe [13].

VMDO separat sau asociat cu razele gama a influențat semnificativ valoarea indicilor morfologici ai descendenților de orz în populațiile provenite de la plantele virozate. Au fost stabilite modificări semnificative ale coeficientului de variație ale taliei plantei, lungimii spicului, numărului de spiculețe, numărului de frați, fiind evidențiate exemplare cu devieri ale caracterelor cantitative de la tipul inițial. Astfel, au fost remarcate exemplare cu talia de cca 40 cm, în timp ce la soiurile inițiale înălțimea minimă a plantelor a constituit nu mai puțin de 50-51 cm. Totodată, diminuarea taliei plantelor a fost asociată cu reducerea numărului de internoduri, ceea ce este un caracter deosebit de important pentru amelioratori. Ca rezultat, au fost selectate genotipuri cu talie joasă și caractere ce determină productivitatea (lungimea spicului, numărul de spiculețe dezvoltate), mai înalte comparativ cu soiului inițial. În baza acestor rezultate, a fost elaborat un procedeu ce are ca noutate utilizarea VMDO în scopul obținerii unui spectru diversificat de caractere cantitative în prima generație, provenită de la plantele virozate, ceea ce permite simplificarea procedurii clasice de inducere a formelor noi cu caractere cantitative de interes ameliorativ [10].

Una din strategiile de perspectivă în crearea materialului inițial valoros este asocierea culturilor *in vitro* cu alți factori recombinogeni (fizici, chimici, biologici). Prin procedeul elaborat ce îmbină infecția virală și cultura *in vitro* au fost obținute somaclone de varză, distinse de soiul inițial și, totodată, superioare regeneranților obținuți pe cale tradițională [6].

Realizările obținute au servit ca suport metodologic pentru asigurarea cursurilor disciplinelor *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 științifice au fost prezentate și aprobate la foruri științifice naționale și internaționale de specialitate: Congr. naț. de biol. „*Emil Racoviță*”, Iași, 16-20 septembrie, 1992; Simp. al 4-lea „*Diversitatea dezvoltării organismelor - sursă de creativitate și valorificări biotehnologice și socio-economice*”, București, 14-16 decembrie, 1995; Congresul al Xth FEBS „*From molecular mechanism to the plant: an integrated approach*”, Roma, Italia, 9 – 13 septembrie, 1996; Conf. „*ECOLOGIA EUROPAEA*”, Strasbourg, Franța, 2-6 octombrie 1997; Simp. Naț. „*Inginerie genetică și biotehnologii moderne*”, Chișinău, 1998; Conf. a XVII de micr. electr. din Rusia, Cernogolovca, 15-18 iunie 1998; Conf. VI Republ. de micr. electr. „*Universalitatea aplicării microscopiei electronice*”, Chișinău, 7-8 octombrie, 1998; Congr. II al Soc. de Botanică din R. Moldova „*Biodiversitatea vegetală a R.M. în preajma mileniului III*”, Chișinău 12-13 noiembrie 1998; Conf. a XX de micr. electr. din Rusia, Cernogolovca, 2-4 iunie, 2004; Conf. „*Probleme actuale ale geneticii, biotehnologiei și ameliorării*”, Chișinău, 17-18 februarie 2005; Conf. „*Probleme actuale ale geneticii, fiziologiei și ameliorării plantelor*”, Chișinău, 9-10 octombrie 2008; Conf. a XXIII de micr. electr. din Rusia, Cernogolovca, Moscova, 31 mai – 04 iunie 2010; Congr. IX-lea al Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova, Chișinău, 26-27 octombrie 2010; Conf. șt. „*Genetica și fiziologia rezistenței plantelor*” (în memoria acad. A.Jacotă), Chișinău, 21 iunie 2011; Conf. șt. intern. «*Значение научного наследия академика ВАСХНИЛ и Россельхозакадемии М. С. Дунина в современных работах ученых России*», Moscova, 24 mai 2011; Conf. șt. „*Structura și funcționalitatea sistemelor biologice – diversitate și universalitate*” (în memoria acad. B. Matienço), Chișinău, 17 Noiembrie 2011; Conf. intern. „*A New Approach of the Academic Research in Biology*”, București, 11-12 decembrie 2012; Simp. naț. cu participare intern. „*Biotehnologii avansate – realizări și perspective*”, Chișinău, 24-25 octombrie 2013; Conf. șt.-practică consacrată aniversării a 70-a a fondării ICCC Selecția „*Rezultatele și perspectivele cercetărilor la cultura plantelor de câmp în Republica Moldova*”, Bălți 20 iunie, 2014;

Conf. șt. intern. „*Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor*”, Chișinău, 23-24 octombrie 2014; Conf. intern. „*Vegetable breeding and seed production*” (VNIISSOK), Moscova, 11-13 august, 2014; Congr. al X-lea Intern. al Geneticienilor și Amelioratorilor din R. Moldova, Chișinău, 28 iunie – 01 iulie 2015; Conf. șt.-practică „*Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы*” (VNIISSOK), Moscova, 10-14 august 2015; Simp. șt. intern. „*Protecția plantelor – realizări și perspective*”, Chișinău, 27-28 octombrie 2015; Conf. intern. șt.-practică „*Фундаментальные и прикладные исследования в биоорганическом сельском хозяйстве России, СНГ и ЕС*”, Moscova, 9-12 august 2016; Simp. al IV-lea național cu participare intern. „*Biotehnologii avansate – realizări și perspective*”, Chișinău, 3-4 octombrie 2016; Conf. intern. „*Agrophysics trends: from actual challenges in arable farming and crop growing towards advanced technologies*”, Sankt Petersburg, 27 - 29 septembrie 2017; Conf. șt. intern. (ediția a VI-a) „*Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor*”, Chișinău, 9-10 octombrie 2017; Congr. intern. *Eucarpia Plante olengenoase și proteice*, Chișinău, 20-24 mai 2018; A 58-a Sesiune Annuală de Comunicări Științifice, Institutul de Biologie București, 12 decembrie 2018; Conf. intern. șt.-metodică a V-a, Moscova, 15-19 aprilie 2019; Conf. II-a intern. în memoria acad. E. I. Ermacova „*Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего*”, Sankt Petersburg, 02-04 octombrie 2019.

Cercetările științifice expuse în teză au fost realizate în cadrul a 4 proiecte: ”Principii biotehnologice de studiu al interacțiunii dintre plantele de cultură și agenții virali” (2015-2019); ”Biotehnologii avansate și mecanisme genetice și fiziologice de inducere a variabilității genotipice și formarea unui potențial genetic sporit de productivitate și rezistență al C₃ și C₄ plantelor” (2011-2014); ”Studiul variabilității genetice indusă de factori fizici, chimici și biologici *in vivo* și *in vitro*, evaluarea genetică și moleculară a caracterelor de productivitate, calitate și rezistență la condițiile nefavorabile ale mediului” (2006-2010); ”Cercetarea mecanismelor de dirijarea a variabilității genetice la plante. Elaborarea a noi principii și tehnologii de evaluare și selectare a genotipurilor valoroase. Elaborarea metodelor eficiente de apreciere a productivității și rezistenței plantelor de cultură la factorii nefavorabili pe baza principiilor biotehnologice” (1996-2000). Rezultatele de bază au fost discutate și aprobate la dările de seamă a Consiliul Științific al institutului în perioada realizării cercetărilor (a.a. 1994-2018).

Publicații la tema tezei. Principalele rezultate la tema tezei au fost publicate în 74 de lucrări științifice, inclusiv: 1 monografie monoautor, 7 articole în reviste din străinătate recenzate, 9 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, 22 articole în culegeri științifice, 22 teze la manifestări științifice din străinătate și țară, 5 brevete de invenție, inclusiv 2 pentru soi de plantă, o îndrumare metodică.

SUMARUL COMPARTIMENTELOR TEZEI

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: virus, plantă, proliferare celulară, microsporogeneză, recombinare meiotică, recombinare somatică, patogeneză virală, variabilitate genetică, polimorfism proteic, marcheri moleculari.

În **Introducere** este prezentată caracteristica succintă a lucrării: 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.

În **capitolul I** este expusă analiza literaturii de specialitate la nivel național și mondial ce vizează **Citogenetica patogenezei virale**, fiind prezentată sinteza informației privitor la organizarea moleculară a fitovirusurilor și strategiile de expresie a genelor virale, mecanisme de reacție a plantelor la infectare cu virusuri; descrise tipurile de rezistență și factorii ce denumită sensibilitatea declanșată de efecte; prezentat sumarul datelor ce reflectă impactul infecțiilor virale la plantele gazdă la nivel structural și funcțional; analizați factorii ce influențează proliferarea celulară și inductori ai diversității genetice la plante. Identificate obiectivele ce constituie reper pentru evaluarea procesului de patogeneză virală al sistemelor gazdă-patogen formate în baza virusurilor cu diferite tipuri de genomuri (ADN, ARN) și strategii de replicare, în lipsa datelor ce vizează aspectele citogenetice ale patogenezei virale și impactul virozelor asupra proliferării celulare și evenimentelor ce stau la baza variabilității genetice (recombinarea meiotică și somatică), precum și evidențierea influenței virusurilor asupra descendenților plantelor infectate.

Capitolul 2 **”Materialele și metodele de cercetare”** include locul și condițiile desfășurării cercetărilor, metodologia de studiu, descrierea materialelor biologice și metodelor de investigație utilizate; metodele statistice și pachetele de programe pentru stabilirea veridicității datelor experimentale.

În Capitolul 3 **”Expresii citopatologice ale virozelor la plantele de cultura”** sunt expuse rezultatele studiului ultrastructural al patosistemelor cauzate de VAT, VXC, VMT, VMDO și VMCo în celulele mezofilului frunzelor, tapetumului și endoteciului anterelor, precum și celulele microsporale; identificate reacțiile specifice induse de infecțiile virale, descrise restructurările celulelor infectate ale gazdelor susceptibile și tolerante de tomate, orz de primăvară și varză. Sunt reflectate particularitățile morfostructurale ale grăuncioarele de polen ale plantelor sistemelor virus-gazdă analizate; stabilită specificitatea reorganizărilor în dependență de gradul de patogeneză și tipul reacției gazdei la patogen.

Capitolul 4 **”Microsporogeneza la tomate și orz în condiții de patogeneză virală”** include rezultatele studiului microsporogenezei la tomate și orz, evidențierea particularităților recombinării și regularităților diviziunilor meiotice la plantele infectate și descendenții obținuți în condiții de patogeneză. Sunt analizate fluctuațiile recombinării meiotice în baza evaluării numărului și distribuției chiasmelor în dependență de genotip, agent patogen comparativ cu razele gama. Demonstrat impactul infecțiilor virale în conjugarea cromozomilor, distribuirea materialului genetic cu evidențierea puterii de influență a surselor de variație (virus, radiație gama, genotip), evidențiate interrelațiile dintre sterilitatea masculină și tipurile de aberații cromozomale și frecvenței sporadelor anormale. Dovedită capacitatea infecțiilor virale de a produce la descendenții plantelor infectate sistemic sporirea coeziunilor sinaptice și redistribuirea schimburilor cromatidice, drept sursă de generare a variabilității genetice. Evidențiate efecte destabilizatoare ale microsporogenezei la genotipurile de tomate și orz infectate cu virusuri ce condiționează sporirea asincronismului și accelerarea promovării etapelor meiozei.

Capitolul 5 **”Evaluări citogenetice ale patogenezei virale la plantele infectate și la descendenții acestora”** conține rezultatele evaluării corelațiilor dintre aspectele ultrastructurale ale celulelor mezofilului genotipurilor de tomate cu diferit tip de răspuns la infecțiile virale (rezistență,

toleranță, susceptibilitate) și reacțiile defensive susținute de factori antioxidanți enzimatici (pe exemplul peroxidazei, polifenoloxidazei) și nonenzimatici (α -tomatinei). Determinate însușirile mitogene, aneugene și clastogene ale virusului mozaicului dungat al orzului ce includ modificări ale procesului de recombinare somatică; 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) la plantele infectate și descendenții obținuți în condiții de patogeneză virală. Stabilite efectele nucleopatice de poziție, exprimate prin reconformări ale cromatinei, eterogenitatea tisulară dependentă de tipul patosistemului (țesut mezofilian nemodificat macro-structural, cu malformații și asociat malformațiilor) la gazdele de varză infectate cu virusul mozaicului conoidei. Rezultatele evaluărilor citogenetice ale patogenezei virale au permis stabilirea reacțiilor specifice și nespecifice în sistemele gazdă-patogen formate din virusuri cu diferite strategii de replicare și genom ARN sau ADN.

În Capitolul 6 **”Manifestarea caracterelor cantitative și calitative la plantele infectate cu virusuri și la descendenții acestora”** este prezentată analiza datelor cuantificării caracterelor cantitative în descrierea genotipurilor și distingerea indivizilor cu particularități specifice din sistemele gazdă x patogen, create în baza tomatelor, orzului de primăvară, soiurilor de varză infectate cu virusuri compatibile, precum și descendenților obținuți în condiții de patogeneză virală. Apreciată variabilitatea caracterelor și stabilită puterea de influență ca sursă de variație a genotipului, virusului, comparativ cu razele gama. Identificați marcheri proteici și enzimatici eficienți în estimarea diversității intrapopulaționale. Sunt argumentate 3 procedee inovaționale de majorare a variabilității genetice la plantele de cultură (tomate, orz de primăvară, varză) cu utilizarea infecției virale.

În capitolul rezumativ **„Sinteza rezultatelor obținute”** sunt analizate rezultatele tezei prin prisma opiniilor din literatura tematică de referință, care au condus la fundamentarea direcției ***Citogenetica descriptivă.***

Concluziile generale și Recomandările practice postulează rezultatele propriilor cercetări ce argumentează semnificația teoretică și valoarea practică a acestora.

Bibliografia include 490 surse din literatura de referință la tematica abordată, inclusiv cele mai importante lucrări științifice ale autorului (35).

1. CITOGENETICA PATOGENEZEI VIRALE

1.1. Organizarea moleculară a fitovirusurilor și strategiile de expresie a genelor virale

Datele privitor la taxonomie, proprietățile genetice și biologice ale virusurilor sunt menținute și actualizate de către Comitetul Internațional pentru Taxonomia Virusurilor (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV). Baza de date este expusă pe *site-ul* public cu acces deschis, iar informația despre virusuri, inclusiv a plantelor este sumarizată și actualizată [190]. Conform primul raport al ICTV publicat în 1971, au fost descrise 290 virusuri, fiind clasificate după morfologia particulelor, structura genomului, proprietățile biologice și serologice în 43 genuri și 2 familii. Informația este permanent completată, actualizată după cele mai recente rezultate științifice [253]. La moment este aprobat al 10-lea raport expus în 2016 și publicat online [190], conform căruia sunt descrise 4404 specii de virusuri, grupate în 8 ordine, 122 familii, și 735 genuri. Actualmente, sunt cunoscute cca 1500 virusuri reprezentanți ai 57 genuri ce infectează și produc maladii de diferită gravitate la plante [198].

Cunoștințele despre înțelegerea genomului și organizarea moleculară a virusurilor a avansat rapid în paralel cu dezvoltarea tehnicilor biologice de studiu.

În baza tipului și particularităților acidului nucleic se disting următoarele categorii de virusuri: ADN dublu catenar de tip ciclic (ADNdc), ADM monocatenar (ADNmc) reprezentat prin molecule circulare mono- sau multicomponente, ARN dublu catenar (ARNdc), ARN monocatenar cu catenă + (ARNmc (+)), ARN monocatenar cu catenă - (ARNmc (-)).

Virusurile *Rhabdoviridae* și *Bunyaviridae* dețin ARNmc (-), *Reo-* și *Partiviridae* – ARNdc fragmentat în 2, 10-12 segmente distribuite în diferite particule, genomul *Caulimoviridae* este de tip ADNdc, iar reprezentanții familiilor *Geminiviridae* - ADNmc.

După formă virusurile plantelor pot fi:

- **izometrice** cu un diametru de la 18 nm (de exemplu virusul necrozei tutunului) până la 26 nm (virusurile genului *Necrovirus*),

- **liniare** cu diametrul de 20-25 nm și lungimea 100-300 nm, particule rigide în care se poate distinge elementul central. Cele mai cunoscute sunt virusurile genului *Tobamovirus* (de ex. virusul mozaicului tutunului),

- **filamentoase** cu diametrul de 12 nm și lungimea până la 740-760 nm de formă flexibilă. Din această grupă morfologică fac parte potivirusurile (virusul X al cartofului, virusul Y al cartofului ș.a.),

- **baciliforme** cu diametrul de 30 nm și lungimea până la 300 nm. Mai răspândiți sunt reprezentanții genului *Badnavirus*.

O grupă morfologică separată formează *Geminiviridae* cu particule izometrice 30 x 18 nm și componenți secundari.

Virusurile ARNmc constituie cca 75% din virusurile plantelor și sunt clasificate în peste 25 unități taxonomice distincte [201] conform morfologiei particulelor care poate fi liniară, filamentoasă sau izometrică.

Virusurile ARN prezintă o variație largă a organizării genomului și pot avea diferite structuri terminale cum ar fi proteinele legate de genom (VPg) la capătul 5' și o structură codală poli(A) sau ARN-like la capătul 3' [159]. Genomul unor virusuri este împărțit între două sau mai multe segmente care pot fi încapsulate în aceeași particulă sau în particule virale separate (virusurile multicomponente).

Un progres în înțelegerea replicării ARN viral a fost marcat de descoperirea ARN-polimerazelor ARN-dependente (RdRps). RdRps au fost descrise pentru mai multe virusuri ARN, de exemplu virusul mozaicului bromusului (VMB), virusul mozaicului clorotic al fasoliței (VMCF), virusul mozaicului galben al lalelei (VMGL), virusul mozaicului castraveților (VMC), virusul mozaicului lucernei (VML), virusul mozaicului tutunului (VMT), virusul ofilirii pătate a tomatelor (VOPT) ș.a. [81]. În studiile *in vitro*, a fost dovedită implicarea RdRps doar în sintetiza catenei ARN-minus pentru VMB, VMCF, VML și VMGL [178]. Pentru fitovirusuri a fost dovedită incapacitatea unor RdRps virale de a finaliza ciclul de replicare, fiind necesari diverși factori ai gazdei [107]. Totodată, RdRps virale acționează ca replicaze sau transcriptaze, sintetizând ambele tipuri de catene (-) sau (+). Mai mult decât atât, RdRps nu numai că catalizează ARN-polimerizarea, dar, pentru multe virusuri, efectuează, de asemenea, modificarea ARN, prezentând activitate metiltransferazică.

Replicarea virusurilor ARNmc (+) are loc în citoplasma celulelor infectate. Unul dintre reprezentanții cu asemenea tip de genom este virusul mozaicului tutunului (VMT), pentru care este descrisă legarea ARN-polimerazelor de proteinele membranare, și de alte proteine implicate în replicare ce dețin domenii cu afinitate membranară, de ex. P58 codificată de ARN1. Cu toate

acestea, sediul exact în care are loc replicarea ARN, nu este clar definit și se deosebește pentru diverse virusuri. Incluziunile granulare au fost invocate ca *site*-uri pentru replicarea ARN-ului VMT [402].

Replicarea virusurilor ARN (+) poate fi divizată în patru etape: (i) deproteinizarea și expunerea acidului nucleic proceselor de replicare; (ii) traducerea ARN viral, în timp ce acidul nucleic servește ca ARN de mesaj și produce proteine structurale și non-structurale. În continuare acest proces este împărțit în translația timpurie a proteinelor necesare pentru replicare, de ex. RdRp și translația secundară sau târzie a proteinelor cu alte funcții, de ex. proteina de acoperire. Replicarea genomului (iii) care produce molecule de ARN ale genomului viral are loc în două etape, ambele catalizate de RdRp: (1) sinteza unei molecule complete (negative) complementare ARN genomic (pozitiv); (2) sinteza ARN genomic și ARN-ilor subgenomice, folosind ARN negativ ca matriță. La etapa finală (iv) descendentele genomice sunt încapsulate. Complexul proteic necesar replicării ARN negativ solicită un motiv de recunoaștere la capătul 3', precum și la extremitatea 5', care este important pentru declanșarea procesului de infecție. De asemenea, în replicarea ARN(+) viral au fost identificate structuri asemănătoare ARNt, pseudo-nodulilor replicativi, structurilor poly-A [438] și secvențe similare regiunilor de control intern (ICR) [70]. Prezența secvențelor ICR sugerează că o polimerază ARN III a gazdei ar putea fi implicată în replicarea ARN-ului viral [81].

Replicarea virusurilor ARNmc (-). Virusurile ARNmc cu catenă negativă reprezintă un grup mare de virusuri cu genom mono- sau multipartit, divers ca morfologie și proprietăți. În cazul genomului nesegmentat ARN-urile virale prezintă complexe ribonucleoroteice care servesc ca ARNm pentru sinteza proteinelor virale și ca matriță pentru replicarea ARN-ului viral [81].

În procesul de replicare a ARN viral ca produși intermediari se formează molecule de ARNdc de mărime mică, compuse din fragmente ale catenelor de ARN pozitive și negative.

Etapile de replicare și asamblare ale noilor particule virale se realizează în structuri membranare formate din cisterne ale reticulului endoplasmatic asociate cu elementele citoscheletului numite viroplasmе [476].

Virusurile ADN, replicarea cărora are loc după schema ADN→ADN, utilizează toți factorii necesari ai gazdei, fiind dependente de fazele ciclului celular.

Plantele sunt infectate de două grupuri majore de virusuri ADN: *Geminiviridae* – genomul este reprezentant prin ADN monocatenar și *Caulimoviridae* (ce include două ordine *Caulimovirus* și *Badnavirus*) cu genom ADNdc.

Geminivirusurile posedă genom mic, reprezentat printr-o singură moleculă monocatenară de ADN, iar replicarea se realizează în nucleu prin formarea de molecule intermediare de ADN dublu catenar, folosind toți factorii de replicare ai gazdei. Virusul mozaicului auriu al tomatelor, ca și majoritatea geminivirusurilor, codifică în gazdele infectate proteină AL3 sau C3, care intensifică acumularea de ADN viral printr-un mecanism necunoscut. S-a demonstrat, că AL3 formează oligomeri și interacționează cu inițiatorul de replicare viral. Totodată sunt raportate rezultate prin care se constată, că AL3 prezintă omologie cu proteina supresoare a tumorilor la mamifere, retinoblastomul (Rb) [374].

Ciclul replicativ al virusurilor *Caulimoviridae* include două etape: (i) nucleară, în timpul căreia ADN viral este transcris de către ARN-polimeraza II ADN dependentă a gazdei cu formarea a 2 transcripti (19S și 35S) (Figura 1.1). Cea de-a II etapă se produce în citoplasmă și rezultă cu translarea ARN 19S și sinteza proteinei 62 kDa, în timp ce molecula 35S este transcrisă de ADN-polimeraza dependentă de ARN (transcriptaza inversă) cu formarea de ADN-uri virale.

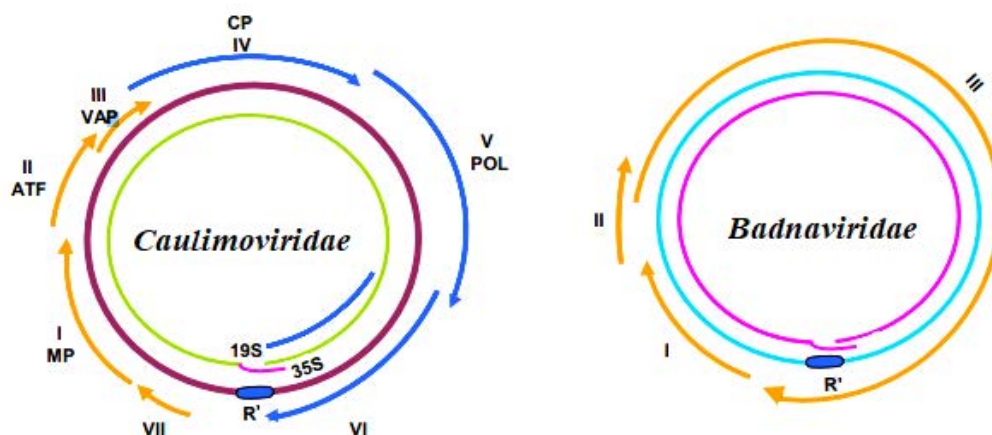


Fig. 1.1. Reprezentarea schematică a hărții genomice și transcrierii produșilor la virusurile ADN (A – *Caulimoviridae*, B – *Badnaviridae*) (după [351]).

Pentru unii reprezentanți ai familiei *Badnaviridae* și anume virusul dungat al bananului (VDB), virusul clarifierii nervurilor tutunului (VCNT) și virusul clarifierii nervurilor petuniei (VCNP) a fost descrisă integrarea genomului viral în cel al plantei gazdă [173]. Pentru VDB și VCNP numărul de loci specifice integrării este redus, iar pentru VCNT destul de ridicat. Autorii concluzionează, că fenomenul integrării genomului viral în cel al plantei gazdă este destul de răspândit în natură, mai dificil fiind identificarea factorilor care conduc la o asemenea interacțiune.

Un studiu amplu al integrării VDB în genomul mai multor specii gazdă este prezentat de Gayral F. și coaut. [151]. Consecutivitățile integrate sunt definite ca pararetrovirusuri endogene (*endogenous pararetroviruses*, EPRVs), care pot varia de la fragmente mici până la genomul integru. Asemenea consecutivități ulterioare pot fi fixate în genomul plantei, fiind astfel transmise generațiilor ulterioare. Surprinzătoare sunt datele autorilor privitor la posibilitatea extruziei secvențelor EPRVs și realizarea procesului infecțios spontan, ceea ce poate avea loc în urma acțiunii diferiților factori de stres. Culturile *in vitro* de asemenea favorizează trecerea fragmentelor inserate în stare epizomală. Pentru VDB sunt descrise două forme de existență integrată: una neinfecțioasă ce conține genomul viral incomplet și un stop codon, constatată la specia *Musa balbisiana*. Cea de-a doua formă EPRV conține genomul viral complet. Fragmentele EPRV, diferă mult nu doar după structură, ci și după numărul de copii din cadrul genomului. Fragmentele integrate EPRV-7 și EPRV-9 ale VDB, au fost descrise în ambele cromatide surori, posedând alelism.

Gayral F. și coaut. [151] propun două scheme posibile conform cărora poate avea loc integrarea EPRV în genomul plantelor gazdă. După un model (A), recombinația se realizează cu antrenarea ARN pregenomic rezultat în urma procesului infecțios productiv cu implicarea *Ty3/gypsy* revers-transcriptazei (Figura 1.2). Un asemenea complex *Ty3/gypsy-VDB* BSGfV a fost constatat în cinci introni ai genei *mom*. Conform celei de-a doua scheme se remarcă integrarea ADN-ului BSGfV sub forma unui element transpozabil. Acest proces se poate produce în timpul replicării ADN-ului celular și repararea rupturilor produse. Integrarea EPRV a fost stabilită preferențial în zonele heterocromatinice și mult mai rar în cele eucromatinice, cu toate, că localizarea exactă a rămas neidentificată de autori.

Strategiile de translație ale ARN-urilor virale sunt restricționate de ribozomii celulei gazde. Există mai multe moduri de bază prin care informațiile codificate pe ARN virale sunt traduse în produse proteice finale: (i) genomul poate fi împărțit în ARN subgenomice care conțin fie gene monocistronice, fie gene policistronice (de ex. translarea ARN-lui VMT); (ii) ribozomii realizează sinteza proteinelor până la unul sau mai mulți codoni stop, formând astfel două sau mai multe proteine de pe aceeași regiune de ARN; (iii) întregul ARN al virusului poate fi tradus ca un ARN de mesag monocistronic, iar poliproteina rezultată este apoi fragmentată de proteaze în produse mai mici, precum la *Como*-, *Nepo*- și *Potivirusuri*. Al patrulea mecanism de translație al ARN-ului viral include mai multe cadre de citire. Inițial un asemenea mecanism a fost descris pentru virusul de sud al mozaicului la fasole [157].

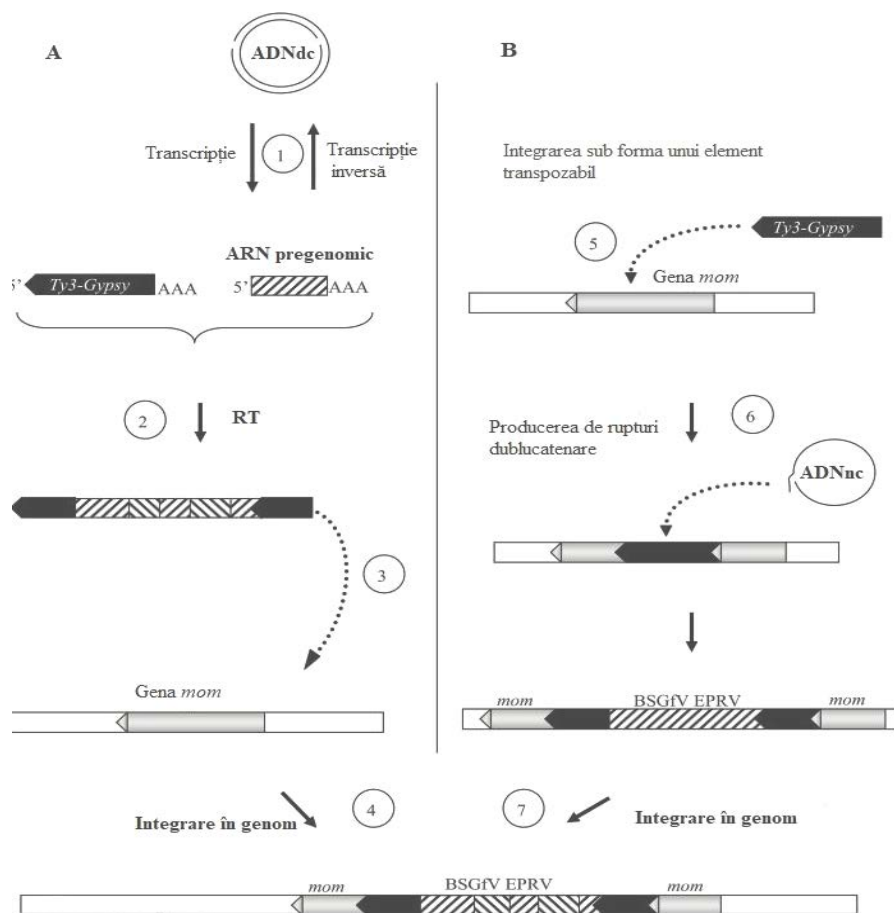


Fig. 1.2. Reprezentarea schematică a integrării genomului viral VDB (tulpina BSGfV) în genomul *Musa balbisiana* (după [151]).

Atât la plante cât și la animale, relațiile dintre genomul virusurilor și ale celulei-gazdă se stabilesc în procesul de replicare a genomului viral. Asigurarea sintezei de către celulă a compușilor proprii virusului este asociată cu blocarea formării și transportării tuturor tipuri de ARN din nucleu în citoplasmă, precum și tranzitării membranei nucleare din citoplasmă în nucleu a factorilor de transcripție [455], ceea ce se realizează prin intermediul unui sistem complex cu antrenarea proteazelor. Inhibarea sintezei transcripțiilor celulare și a transportului nucleocitoplasmatic se produce cu implicarea proteazei C3. Ținte pentru proteaza C3 constituie factorul de transcripție TFIID, implicat în sinteza subunităților ribozomale 28S, 18S și 5,8S cu antrenarea ARN polimerazei I [63; 208] și ARNm realizat prin intermediul ARN polimerazei II [275]. Astfel, proteaza C3 scindează TBP - componentul de bază al TFIID după legăturile Gln-Gly, reprimând activitatea ARN polimerazei II. De asemenea, proteaza C3 scindează un alt component al TFIID, și anume proteina

TAF110, influențând activitatea ARN polimerazei I [63]. Proteaza C3 este implicată și în blocarea tranzitării transcripturilor proprii ai celulei din nucleu în citoplasmă prin distrugerea complexului nucleoporinic 153-p62, ceea ce duce la acumularea ARNm în nucleu. Pentru sinteza acidului nucleic al virusului este necesară antrenarea tuturor elementelor celulare cu depășirea concurenței după ribozomi. Pe exemplul picornavirusurilor Гаврюшина Е. [455] demonstrează inhibarea sintezei inductorilor apoptozei și a citochinelor.

În baza paternului de interacțiune plantă-virus sunt descrise câteva tipuri de fenomene implicate în reducerea activității genelor virale prin protecția încrucișată (i), reprimarea simptomelor (ii), sinergie (iii) și rezistența non-gazdă (iv) [147].

Protecția încrucișată apare atunci când infecția provocată de o tulpină virală previne infectarea ulterioară de către o tulpină mai agresivă sau un al doilea virus din aceeași specie [241]. Deși nu sunt cunoscute mecanismele protecției încrucișate, în conformitate cu modelul antiviral de reducere a ARN-ului, un rol important este atribuit pentru ARNsi.

Reprimarea simptomelor a fost descrisă în mai multe combinații plantă-virus. Gazdele infectate acumulează concentrații înalte de germeni virali și dezvoltă simptome vizibile, cu toate acestea, frunzele tinere de la nivelurile superioare conțin titre de virus mai scăzute și nu exteriorizează simptome. Este stabilit, că ARN-urile *si* formate în partea inferioară a plantei la locul infectării sunt transportate sistemic prin planta, prevenind astfel invazia virusului [278].

Sinergia virală poate fi stabilită în cazul co-infecției cu două sau mai multe virusuri, ca rezultat producându-se o boală cu simptome mai severe decât infecția provocată de un singur virus [429]. Majoritatea cazurilor documentate de sinergie virală atestă implicarea virusurilor din genul *Potyvirus*, care depind de factorii HC-Pro sau P1 [91; 429]. Se consideră, că supresoarele HC-Pro sau P1 leagă ARN-urile *si* derivate de virusurile co-infectante, ducând la acumulări mai mari de virusuri și dezvoltarea simptomelor severe [429].

Conform mai multor mecanisme, **rezistența non-gazdă** este explicată prin reducerea translației, replicării sau mișcării ARN-ului viral sau prin determinanți genetici ai gazdei [116; 210].

1.2. Mecanisme de reacție a plantelor la infectarea cu virusuri

Fitopatogenii se limitează la un anumit cerc de specii-gazdă. În general, majoritatea virusurilor au un număr limitat al gazdelor în habitatele naturale, iar procentul așa-numitelor non-gazde depășește cu mult numărul genotipurilor sensibile. Pentru agenții patogeni, inclusiv virusurile care nu pot infecta plantele, este descris mecanismul numit **rezistență non-gazdă** (RNG, *Non-Host*

Resistance) [409]. RNG este aplicabilă pentru toți agenții patogeni ai plantelor și prezintă o rezistență generică, nespecifică care poate fi divizată în două tipuri principale, distincte după mecanismul și modul de recunoaștere a patogenului [313]. Tipul RNG prezintă un mecanism de apărare, exprimat, de exemplu, prin îngroșarea peretelui celular, producerea de metaboliți secundari etc. Acest tip de rezistență, numită și **rezistență extremă** (RE, *Extrem Resistance*), se manifestă, de obicei, asimptomatic, declanșându-se rapid și determinând eliminarea timpurie a virusului, fără inducerea stresului oxidativ [180]. Un răspuns al gazdei care urmează mai lent este asistat de un anumit grad de replicare și deplasare a virusului și este complementat de inducerea stresului oxidativ și moartea programată a celulelor (răspunsul hipersensibil, RH). Reacția acestor plante depinde în mare măsură de viteza răspunsurilor gazdei, inclusiv a acumulărilor de specii reactive de oxigen la locul infectării primare. Acest tip de RNG este asociat cu inducerea necrozelor și se produce atunci când agenții patogeni depășesc rezistența de primul tip. În acest caz, agentul patogen este recunoscut de structuri sau proteine specifice care sunt asociate cu agentul patogen. Recunoașterea acestor structuri / proteine, numite paternuri moleculare asociate cu patogenii PAMPS (*Pathogene Associated Molecular Patterns*), are loc prin receptori de recunoaștere (*Pathogen Recognition Receptors*) ai membranelor plasmactice ale celulelor gazdei. Acești receptori recunosc structurile conservate ale agenților patogeni, cum ar fi flagelinul din flagelul bacteriilor, chitina din peretele celular al fungilor și induc un răspuns denumit PAMP, ce generează răspunsul de imunitate indusă (*Plant Triggered Immunity*) [215]. Deoarece virusurile trebuie să depășească bariera fizică a peretelui celular, ele intră în celulele gazdă prin inoculări sau leziuni mecanice, prin intermediul vectorilor cum ar fi insectele, nematodele sau ciupercile. Se consideră, că recunoașterea directă a agentului viral nu se produce în apoplast. Cu toate acestea, este stabilită implicarea receptorilor cu activitate protein-kinazică de tipul RLK, similari celor implicați în recunoașterea PAMP prin receptori de recunoaștere [238].

Unele organisme vegetale reacționează la agenții virali prin implicarea genelor de rezistență specifică față de anumite virusuri. Reacția imunitară mediază o necroză rapidă la locul penetrării patogenului și împiedică răspândirea particulelor prin întreaga plantă. În majoritatea cazurilor, genele de rezistență nu asigură rezistență absolută, fiind atestate niveluri reduse de replicare ale virusului, stabilindu-se rezistență parțială sau toleranță. Unul dintre primele **răspunsuri imune** pe care toate virusurile le întâlnesc atunci când invadează o gazdă constau în inactivarea ARN-ului viral, numit interferența ARN-ului (ARNi) și tăcerea post-transcripțională a genei (PTSG).

Interferența ARN-ului este un răspuns al gazdei declanșat de ARN dublu catenar (dc). Aceste molecule acționează ca PAMP în care ARNi poate fi privit ca un inductor de imunitate produs intracelular [116].

Inactivarea ARN-ului se realizează pe două căi majore: (i) calea ARN-urilor mici de interferență (ARNsi, shot interfering RNA), (ii) calea ARN-urilor de interferență (ARNi). Răspunsul ARNi antiviral este indus de molecule de ARNdc, care apar ca produse intermediare replicative. Aceste structuri sunt detectate de către o ARN-aza de tipul III, enzimă asemănătoare cu Dicer, care realizează clivarea ARNdc în ARNsi cu o mărime de 21-24 nucleotide [377]. Moleculele ARNsi intră un complexul de inducere a inactivării denumit RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Acest complex activat supraveghează și ulterior degradează moleculele țintă ale ARN-ului viral. După generarea ARNsi primare, urmează o amplificare a acestora, necesară pentru stabilirea unui răspuns eficient de combatere a infecțiilor virale la nivel local și sistemic. Această amplificare implică ARN-polimerazele dependente de ARN-ul gazdei, care sunt capabile să transforme ARN-urile virale în ARNdc [105]. Procesarea lor ulterioară conduce la generarea de ARNsi secundare, care corespund secvențelor din afara consecutivității țintei primare, proces denumit **silențiere tranzitivă** [384]. Răspunsul ARNi antiviral acționează împotriva tuturor virusurilor ARN și AND componente și, în general, este un proces relativ lent fără să ducă la eliminarea completă a infecțiilor virale [115; 377].

ARNi, ca și virusurile, pot să tranziteze dintr-un țesut în altul, implicând genele de rezistență. Cele mai multe dintre acestea se activează și conferă rezistență numai pentru un virus specific, însă unele acționează împotriva mai multor virusuri (înrudite). Clasa majoră a acestor gene este reprezentată de gene dominante de rezistență, în timp ce altele sunt gene recesive sau de rezistență parțială. Un exemplu al unor gene de rezistență dominantă este gena Ty-1 a tomatelor împotriva virusului răsucirii și îngălbenirii frunzelor de tomate (VRÎFT, geminivirus). Această genă codifică o ARN-polimerază dependentă de ARN și conferă rezistență la VRÎFT prin amplificarea semnalului ARNi [413]. Plantele de tomate, care dețin Ty-1 nu prezintă simptome la infectarea cu VRÎFT, cu toate că pot deține niveluri reduse ale virusului.

Rezistența recesivă împotriva virușilor este determinată de însușirea gazdei de a deține factori de sensibilitate [406]. Deoarece factorii de susceptibilitate sunt dominanți, rezistența bazată pe aceștea necesită ca toate copiile genei de rezistență să fie în stare recesivă, ceea ce și explică denumirea de rezistență recesivă. Majoritatea genelor de rezistență recesivă împotriva virușilor la

plante au fost raportate pentru potivirusuri [220] și codifică factori de inițiere a translării proteinelor din familiile 4E sau 4G (eIF4E / eIF4G) [406]. Aceste proteine interacționează cu capătul transcripturilor pentru a permite translarea. Transcripturile potivirusurilor nu conțin o structură "cap", ci oferă un VPg (*Virus-Protein genome linked*) ce asigură transcripturilor o independență de situsul "cap". Infecția cu potivirusuri conduce la stoparea translării transcripturilor dependenți de "cap" și permite doar transcrierea independentă de acest situs. Ca rezultat se generează o concurență sau o presiune de selecție dintre translarea mediată de VPg și eIF4e.

Pentru stabilirea unei infecții productive, agenții patogeni trebuie să depășească răspunsul de imunitate și să realizeze codificarea proteinelor care interferează cu receptorii de recunoaștere. Acest proces permite stabilirea procesului de infecție, și o asemenea stare este denumită **sensibilitate declanșată de efecte** (*Effector Triggered Susceptibility*, ETS). Una dintre cele mai comune strategii utilizate de virusuri pentru a contracara ARNi este de a codifica supresoare ale silențierii (RSS), proteine virale care interferează cu ARNi [79]. Majoritatea proteinelor RSS exercită această activitate prin legarea ARN-urilor mici cu ARNdc și, ca consecință fiind împiedicată încadrarea lor în RISC și, respectiv, în clivajul și formarea de ARNsi [243]. Suprimarea virală a ARNi conduce la o etapă a sensibilității declanșate în timpul căreia virusurile sunt capabile să stabilească o infecție productivă.

Produsele genelor dominante de rezistență (R) la un patogen specific se exprimă prin factorii de avirulență (Avr), care se prezintă contrar ETS, conducând la stabilirea imunității (*Effector Triggered Immunity*, ETI). La nivel celular, RH afectează homeostaza și modifică potențialul și permeabilitatea membranelor [311]. De exemplu, infecțiile virale provocate de virusurile mozaicului tutunului și încrețirii ridichilor induc la plantele infectate de tutun și arabidopsis depunerea calozei la nivelul plasmodesmelor, modificând scurgerea de electroliți [106; 331; 440]. Activarea genelor R este, asociată cu inducția unui răspuns al morții celulare programate, care se exteriorizează prin apariția rapidă a leziunilor necrotice (la plantele cu răspuns hipersensibil) sau, în cazuri rare, o rezistență extremă, care se produce fără manifestări externe. Datorită acestor răspunsuri, virusurile se limitează doar la locul de penetrare, prevenind infecțiile. Răspunsul genei R este, în general, rapid și în decursul a 3-4 zile produce izolarea virusului la locul penetrării.

În majoritatea cazurilor de deținere a genelor R, recunoașterea patogenului se produce indirect și implică proteinele gazdei, considerate gardieni [101; 215], însă au fost descrise situații în care produsul dominant al genei R recunoaște o proteină Avr prin interacțiune directă [89; 92].

Cele mai ample informații privitor la reacțiile imune se atestă pentru dicotiledonate cu referire la mai multe familii de plante, în special *Solanaceae*, *Cucurbitaceae* și *Fabaceae*. Mai mult de 80% din rezistența la virusuri este controlată monogenic, celelalte prezentând control oligogen sau poligen. Mai puțin de jumătate din cazurile de rezistență monogenică raportate prezintă moștenire dominantă, iar în majoritatea cazurilor, dominația fiind considerată completă [143].

Este de menționat, că interacțiunea dintre monocotiledonate și virusuri este puțin studiată. Din 31 gene de rezistență clonate, doar una este înregistrată la monocotiledonate [167; 284]. Aceasta este gena eIF(iso)4G1 ce conferă rezistența orezului la virusul marmorării galbene a orezului (VMGO) [33] prin interacțiunea cu proteina VPg [179]. O mutație în eIF(iso)4G1 la orez întrerupe interacțiunea cu VPg, astfel conferind rezistență împotriva VMGO.

Pentru determinarea factorilor patogenității a unor virusuri ce infectează monocotiledonatele, cum ar fi virusul mozaicului dungat al orzului, mozaicului stiat al grâului sau mozaicului bromusului au fost utilizate plante-gazdă dicotiledonate [75; 144; 296].

Genele de rezistență dominante pot fi clasificate în două categorii, și anume cele care codifică NB-LRR-uri și toate celelalte. Clasa majoră a genelor R de tipul NB-LRR codifică proteine care, indiferent de patogenul pe care îl recunosc, constau din trei domenii: (i) situsul de legare a nucleotidelor (NBS) în centrul proteinei, (ii) o repetiție bogată în leucine (LRR) la capătul C-terminal și (iii) un domen CC sau Toll al receptorului interleuchinei-1 (TIR) la capătul N-terminal al produsului genei de rezistență [304; 428]. LRR determină specificitatea proteinei țintă și este partea cea mai variabilă a proteinei. NBS este compus dintr-un domen conservat care conține situsul de legare a nucleotidelor (NB) și altul ARC, ambii fiind necesari pentru legarea și hidrolizarea ATP. Gene R care conțin un domen TIR N-terminal se găsesc numai la dicotiledonate [100].

Majoritatea produselor cunoscute ale genelor R sunt de tip CC-NB-LRR, în timp ce doar un grup mic aparține tipului TIR-NB-LRR. Sunt descrise, câteva gene R dominante care nu aparțin genelor de tip NB-LRR, de exemplu, RTM1, RTM2 și RTM3. Ulterior gene de rezistență au fost identificate la *Arabidopsis thaliana* care împiedică răspândirea sistemică a mai multor *Potyvirusuri*. În aceste cazuri virusul nu poate pătrunde în floem pentru a se răspândi sistemic prin gazdă. În plus, nu există nici o inducere a RH sau a producerii de acid salicilic, așa cum se observă frecvent în cazul răspunsurilor de rezistență mediate de NB-LRR [104]. De asemenea, nu se realizează nici o interacțiune directă între proteinele RTM cu proteina de acoperire a potivirusului. O altă genă de rezistență identificată este JAX, asemănătoare cu gena RTM, care funcționează, în general,

împotriva potexvirusurilor la *A. thaliana*, indicând astfel un rol important în imunitatea plantelor [431]. Un alt tip de gena distinctă R este Tm-1, identificată la speciile sălbatice de tomate *Solanum hirsutum*, care codifică o proteină ce conține TIM. Acest domeniu leagă proteinele de replicare ale virusului mozaicului tomatelor (ToMV), inhibând replicarea ARN-lui viral fără a provoca moartea celulară asociată cu RH [206]. De asemenea, și în aceste cazuri nu este indus nici un răspuns asociat tipului NB-LRR, cum ar fi RH. Atât RTM, cât și Tm-1, joacă un rol important în inhibarea unei etape specifice necesare pentru o infecție productivă.

Din numărul total de gene R împotriva fitovirusurilor, numai pentru cca 1/3 este identificat determinantul Avr. Multe proteine virale funcționează ca constituenți Avr: proteina de acoperire (de exemplu, L-locus din ardei împotriva *Tobamovirusurilor*), proteina de deplasare (Tm-2²/Tm-2² din tomate împotriva *Tobamovirusurilor*), replicaza (Tm-1 la tomate față de virusul mozaicului tutunului) sau proteina supresoare ARNi (HRT la *A. thaliana* împotriva virusului încrețirii ridichilor), care acționează ca inductori ai rezistenței [207; 310]. Pentru majoritatea fitovirusurilor nu sunt identificate gene R, cu toate că sunt descrise exemple de RH [108]. Capacitatea de a induce rezistență mediată de RH poate fi separată de funcția endogenă a proteinelor virale.

Deși modul de acțiune al genelor de rezistență rămâne încă neclarificat, au fost propuse mai multe modele pentru descifrarea stabilirii rezistenței de tip NB-LRR determinate de genele dominante R. Unul dintre modelele cele mai acceptate este “ipoteza gardianului” (*Guard Hypothesis*) [215]. Conform acestui model, produsul genei de rezistență protejează o anumită proteină a gazdei, realizând funcția de "gardian" și percepe modificările acestei proteine după interacțiunea cu determinantul Avr pentru a iniția ulterior un răspuns de rezistență. Totodată, se admite, că produsul mai multor gene R protejează aceeași proteină și *vice versa*, conducând astfel la extinderea spectrului de rezistență al unor gene R la o gamă largă de agenți patogeni. În același timp, acest model nu explică modul în care tulpinile unui virus mențin virulența. Din acest motiv, au fost postulate modele alternative. Conform “modelului de momeală” (*Decoy Model*) [410], o proteină (momeală) acționează ca un senzor molecular pentru a detecta doar un agent patogen fără a avea alt rol. Modelele “momeală și întrerupător” (*Bait and Switch Model*), “capcană pentru șoareci” (*Mousetrap Model*) ipotetizează, că produsul genei R formează un complex cu proteina gazdei (momeală), care prin interacțiune cu proteina Avr induce o cale de semnalizare în aval ce conduce la rezistență [61; 101; 273].

Mecanismul inducției în aval rămâne încă neclar. Pe exemplul genei de rezistență N a tutunului au fost stabilite căi de control al replicării virusurilor și stabilire a rezistenței. Gena N codifică o proteină TIR-NB-LRR și conferă rezistență la virusul mozaicului tutunului. Bhattacharjee și coaut. [68] au constatat semnalizarea în aval a răspunsurilor de apărare, legate de gena R. Studiile au indicat că răspunsul antiviral bazat pe gena N duce la stoparea translației transcripților virali printr-un proces care implică enzima *Argonaute 4*. Ca rezultat, sinteza proteinelor virale este inhibată, împiedicând în cele din urmă acumularea și răspândirea virusului. Conform altor studii a fost demonstrat, că traducerea genelor R este controlată strict prin activarea ARNmi. Astfel, superfamilia miR482/2118 controlează negativ translarea proteinelor NB-LRR [383]. Li și coaut. [255] au demonstrat că și alte familii de ARNmi controlează translarea proteinelor TIR-NB-LRR.

În competiția dintre virus și gazdă, agenții patogeni se protejază de răspunsul imun prin proteinele lor, dintre care unele manifestă afinitate puternică de a lega ARN-uri mici. Ca consecință, astfel de proteine pot suprima inactivarea indusă de ARNmi a genelor R. Considerând că nivelurile ridicate de expresie ale genelor R conduc la autoimunitate [429], proteinele virale de inducere a interferenței pot juca un rol major în inducerea RH.

Genele R dominante declanșează un RH sau un răspuns extrem în cazul în care reacția are loc într-o singură celulă. Ambele răspunsuri implică apoptoza, proces ce duce rapid la moartea celulelor infectate, împiedicând astfel răspândirea sistemică a virusului. Un RH indus implică activarea și sporirea cantității acidului salilic, acidului jasmonic, oxidului de azot, etilenelor, speciilor reactive de oxygen, Ca^{2+} și a proteinelor asociate patogenezii (PR). Se consideră, că fiecare component are o specificitate față de anumiți agenți patogeni, și doar acidul jasmonic, speciile reactive de oxygen și Ca^{2+} sunt elemente eficiente împotriva virusurilor [86; 269].

Date mai recente indică faptul, că RH și apoptoza au căi diferite de inițiere [108]. Nu este stabilit, dacă ambele sunt generate de determinantul Avr al agentului patogen sau dacă RH este declanșată secvențial după răspunsul genei R. Astfel, a fost arătat, că produsul genei Rx a cartofului este o proteină CC-NB-LRR care este declanșată de proteina de acoperire a virusului X al cartofului. Proteina Rx se localizează în citoplasmă, dar poate pătrunde și în nucleu, indicând rezistență [387]. Observații similare au fost expuse și de alți cercetători [78; 152].

În plantele ce dețin gene de rezistență au fost identificate proteine care modulează rezistența răspunsurilor la apărare, cum sunt RanGAP, EDS1-PAD4 [358; 422]. În cazul răspunsului mediat de receptori aceste proteine sporesc reactivitatea gazdei la anumiți agenți patogeni specifici prin

antrenarea răspunsurilor de apărare (producția de radicali liberi, sinteza proteinelor de apărare, moartea celulară programată) [329]. Reacția de apărare mediată de receptori se produce local în *site*-ul de penetrare a particulelor virale, totodată semnalele de răspuns propagându-se în țesuturile adiacente, generând **rezistență sistemică dobândită** (RSD) [416]. Atât pentru gena N a tutunului, cât și pentru Rx1 a cartofului, a fost demonstrată instalarea RSD mediată de calea dependentă de acidul salicilic [265]. RSD previne, de asemenea, infecția provocată de alți patogeni prin activarea sistemică în țesuturi a genelor PR [86; 269].

În protecția antivirală sunt descrise procese generale (ubiquitare) ce implică sistemul proteolitic dependent de *ATP-ubiquitin-proteasom* și metilarea ADN-ului. Inițial moleculele patogenului interacționează cu receptorii plantei provocând un răspuns de imunitate ce rezultă cu reacția de hipersensibilitate [117; 215]. Ulterior este indus un răspuns al imunității, ce include modificări metabolice ale hormonilor, acidului salic, jasmonic, formarea de oxid azotic (NO), acumularea speciilor reactive de oxygen (H_2O_2 , O^{2-}) [86; 106; 284; 331].

Sistemul proteasomic ubiquitar (SPU, *Ubiquitin Proteasome System*) este un factor important în stabilirea interacțiunilor virus-gazdă la aproape fiecare etapă de apărare antivirală, atât în plante cât și animale [95; 146]. La rândul lor, virusurile utilizează o multitudine de strategii de modulare a proceselor SPU. SPU reglementează activitatea celulară, transcripția și transducția semnalelor. SPU implică în primul rând activitatea enzimei ubiquitinei (E1), enzimei conjugată cu ubiquitina (E2) și ubiquitin-ligaza (E3) [200]. Aceste trei proteine formează un complex, care ulterior este degradat de proteosomul 26S.

Modul de abordare a implicării sistemului SPU în stabilirea reacțiilor de apărare împotriva infecțiilor virale sau în promovarea virulenței este discutabil. De exemplu, răspunsul de rezistență a tutunului mediat de gena N împotriva VMT necesită formarea complexului RAR1 / SGT1, care interacționează cu SKP1 și CSN [267], o altă ubiquitin-ligază, care necesită proteine celulare antrenate în creșterea și dezvoltarea plantelor [320]. Proteinele de mișcare ale VMT și virusului mozaicului galben al ridichilor sunt, de asemenea, degradate în mod specific de către echipamentul SPU al gazdei, ceea ce duce la scăderea virulenței și a patogenității [126; 350]. Având în vedere funcțiile diverse ale SPU, în diferite răspunsuri la virusuri gazdele folosesc o varietate de strategii pentru a spori virulența sau a promova imunitatea gazdei.

În mai multe studii cu VXC, VMCo și VMT se subliniază faptul, că răspunsurile la infecțiile virale, deși sunt asemănătoare, derulează pe căi distincte, iar interacțiunile dintre proteinele virale și ale gazdei pot manifesta diferite tipuri de rezistență [283].

În pofida progreselor realizate în cunoașterea bazelor moleculare ale patogenezei virale, există mulți determinanți pentru care mecanismul de acțiune este încă neelucidat. Studiile ce pot contribui la evaluarea situației, impun necesitatea extinderii numărului de patosisteme experimentale și al condițiilor de interacțiune gazdă-patogen, care cu certitudine va conduce la identificarea mecanismelor de rezistență și sensibilitate.

1.3. Citopatologia celulelor vegetale infectate cu virusuri

În cazul infectării plantelor cu virusuri, între genomurile acestora pe parcursul patogenezei se stabilesc interrelații în dependență de tipul reacției gazdei față de acest patogen. Este cunoscut faptul, că doar pătrunderea particulelor virale prezintă semnale ce induc reacții printr-un șir de procese biochimice [170]. Răspunsul la factorii externi este coordonat de o multitudine de gene, care funcționează conjugat în realizarea programului genetic și asigurarea reacției la factorii externi. În dependență de răspunsul gazdei față de infecția virală se disting patru tipuri de plante: sensibile (susceptibile), tolerante, rezistente și imune. În plantele imune virusul se acumulează doar în celulele primar infectate, fără a se distribui prin organele plantei și induce simptome exterioare.

În plantele cu diferit grad de rezistentă, particulele virale se acumulează în celulele primar infectate, cauzând formarea de necroze. Genotipurile tolerante creează condiții optime pentru reproducerea componentelor virali, asamblarea virusurilor și transportul lor prin diferite organe, fără a induce modificări macrostructurale.

Răspunsurile plantelor la infecțiile virale sunt legate de acumularea speciilor reactive de oxigen (SRO). SRO joacă un rol dublu prin (i) determinarea restricției patogenului și, adesea, a inducerii morții programate a celulelor la locurile de infecție și (ii) ca un semnal care induce răspunsuri de apărare legate de sporirea activității antioxidative în celulele adiacente [180]. Aceste reacții ale gazdei determină un dezechilibru al metabolismului celular și al patogenului. Consecință finală a acestor procese, în cazul infecțiilor productive, este o pierdere parțială sau aproape completă a controlului asupra invaziei virusului. Pentru inducerea unei infecții productive virusurile au nevoie nu doar să depășească barierele de apărare ale plantei, dar și a multor procese intracelulare care ar permite realizarea procesului de reproducere [289]. Inițierea acestui ciclu depinde de natura

materialului genetic al virusului. Virusurile ARN pozitive sunt cele mai numeroase. Pentru aceste virusuri, după pătrunderea particulelor în celulă are loc deproteinizarea și traducerea ARN-ului, procese stric coordonate. Există factori ce asigură cuplarea între sinteza proteinelor virale și asamblarea acestora cu ARN viral, și factorii gazdei pentru a forma complexe de replicare. Următoarea etapă a ciclului implică propagarea spre celulele vecine și răspândirea acestora prin întreaga plantă. Pentru stabilirea condițiilor de sensibilitate este necesară facilitarea interacțiunilor factorilor virali și celulari, ca rezultat fiind afectate în mod indirect procesele fiziologice ale gazdei.

Pentru multiplicare virusurile necesită țesuturi vii și, de obicei, nu provoacă moartea gazdelor, deși există și excepții. Conform multiplelor dovezi a fost stabilit că pentru realizarea ciclului lor de viață, virusurile trebuie să depășească barierele de apărare ale plantelor fără a perturba funcțiile gazdei. Drept consecință, componentele virale interacționează și / sau interferează cu constituenții gazdei care, la rândul lor, conduc la modificări ale proceselor fiziologice, rezultând cu dezvoltarea simptomelor.

În plantele sensibile, infecția productivă este însoțită de diverse macro- și micromodificări. Simptomele exterioare induse de către virusuri la plantele susceptibile prezintă diverse aspecte: clarifieri, cloroze, deformații, mozaic. Procesele de reproducere ale particulelor agentului patogen interferează cu procesele celulare, cum ar fi metabolismul intracelular (al proteinelor, hidraților de carbon), reproducerea celulară și transportul endogen al macromoleculelor [106; 148].

Conform mai multor date în frunzele plantelor infectate cu virusuri se constată modificarea conținutului de glucide. De exemplu, în cotiledoanele de *Cucurbita pepo* la infectare cu virusul mozaicului castraveților (VMC) se atestă acumularea zahărului solubil, în timp ce conținutul amidonului scade [439]. La plantele de dovlecel infectate cu VMC autorii remarcă reducerea activității ADP glucoso-pirofosforilazei, enzimă implicată în conversia amidonului în glucide libere, așa că glucoza, fructoza. Aceste modificări, la rândul lor generează perturbări în activitatea funcțională a celulelor infectate. Sunt cunoscute rolul și efectele hidraților de carbon în reglarea expresiei genelor [164]. De exemplu, concentrația sporită de zaharuri liberi inhibă fotosinteza prin reprimarea expresiei genelor ce controlează sinteza proteinelor clorofilei *a* și *b*, subunităților *Rubisco* și plastocianinei [114].

Interacțiunea dintre plante și virusuri are loc printr-un sistem patofiziologic complex, în care rezistența, toleranța și susceptibilitatea, declanșează modificări ale expresiei a sute de gene. Studiile comparative de proteomică a patogenezei provocate de reprezentanți din genurile *Tobamovirus*,

Cucumovirus și *Potyvirus* au demonstrat o reprimare a proteinelor asociate cu aparatul fotosintetic, corelată cu perturbarea sintezei proteinelor antrenate în metabolismul energetic, ceea ce indică o restricționare majoră a metabolismului celular. Schimbări semnificative includ modularea metabolismului zaharurilor, peretelui celular [85]. Conform Panavas T. și coaut. [332] infecțiile provocate de virusurile mozaicului bromusului și piticirii tomatelor afectează biosinteza proteinelor, metabolismul proteic și procesele transcripționale.

Un urma unor studii moleculare a fost arătat, că virusul mozaicului galben al tomatelor (geminivirus) induce acumularea în celulele infectate a factorului proliferativ [315]. Autorii constată implicarea proteinchinazelor în facilitarea propagării infecției prin organele plantei. Se consideră, că această cooperare este importantă pentru virusurile cu capacități productive limitate. Proteinchinazele reprezintă un component important al transducției semnalului stresogen în celulele eucariote, jucând un rol major în recunoașterea factorului patogen și al căii de răspuns [339].

Pentru explicarea procesului de patogeneză sunt propuse două modele generale conform cărora se analizează formarea simptomelor și dezvoltarea bolii. Modelul autogenezei competitive sugerează că replicarea virusurilor se produce cu o asemenea intensitate, încât să utilizeze la maximum resursele metabolice ale plantei, afectând astfel în mod negativ creșterea și dezvoltarea acesteia. Pe exemplul plantelor de tutun infectate cu VMT a fost demonstrat, că deși ARN-ul viral constituie cca 1% din greutatea unei frunze proaspete, cantitatea de proteine virale poate atinge peste jumătate din producția totală de proteine din celulele infectate [201]. Alternativ, simptomele de boală pot apărea prin perturbări ale proceselor cauzate de interacțiunea dintre componentele specifice ale virusului și ale gazdei.

Reproducerea virusurilor și dezvoltarea simptomelor sunt în relații de concurență cu elementele celulare ce asigură procesele de transcriere și translație. În mod similar, au fost observate diminuări ale expresiei genelor gazdei, atât la nivel transcripțional, cât și translațional la locul de replicare a virusului în țesuturile de plante infectate. Se consideră, că inhibarea genelor gazdei reprezintă o metodă de majorare a disponibilității resurselor gazdei pentru sinteza virusului.

Integrarea datelor *microarray* și de proteomică a răspunsului cartofului la infectare cu virusul Y al cartofului a demonstrat discordanțe dintre transcripție și abundența proteinelor ce denotă complexitatea procesului de patogeneză virală [393].

Infecția provocată de un virus într-o gazdă susceptibilă poate induce activarea a peste 4000 de gene. Totodată, diferite virusuri produc răspunsuri diferite într-o gazdă comună, precum și

modificări specifice. Este demonstrat, că acidul nucleic viral cauzează stabilirea **reacțiilor specifice** prin generarea sintezei unor molecule cum sunt ARN_{dc}, ARN_i, ARN_{si}, proteine ale familiei *Argonaute*, polimerazelor, helicazelor [129]. Aceste rezultate dovedesc complexitatea procesului de patogenitate, magnitudinea și diversitatea proceselor metabolice de apărare ale plantelor gazdă împotriva infecțiilor virale.

Plantele sensibile reacționează la infecția virală prin activarea expresiei multor gene, inclusiv a celor ce codifică proteinele PR (*Pathogenesis-Related Proteins*) [476]. Sinteza proteinelor PR poate fi inițiată de diferite situații patologice: atacul insectelor, nematodelor, fungilor, bacteriilor, viroizilor, precum și a virusurilor. Proteinele PR au fost descrise încă în anul 1969 de către Gianinazzi S. și coaut. [cit. după 476] în cazul infectării cu virusul mozaicului tutunului al plantelor de tutun rezistente la acest agent. Dacă inițial se considera, că proteinele PR sunt asociate de răspunsul plantelor cu reacție supradominantă față de virusuri, în urma mai multor cercetări a fost stabilit, că ele pot fi sintetizate și în plantele de tutun sistemic infectate cu virusul mozaicului tutunului [143]. Ulterior, date similare au fost constatate și pentru alte gazde ce au prezentat sensibilitate pentru diverse virusuri. Se consideră, că acumularea proteinelor PR depinde de gradul de atac al tulpinii virale. Astfel, activitatea ARN-azei a fost mai majoră în condițiile unor simptome acute. La fel, activitatea β -1,3-gluconazei este mai sporită în plantele de soia ce au manifestat expresii macrostructurale grave la infectarea cu virusul mozaicului soiei comparativ cu plantele lipsite de simptome [39]. Conform spectrului electroforetic al proteinelor PR, în extractele plantelor de *Datura stramonium* sănătoase și infectate cu tulpini ale virusului X al cartofului, nu au fost constatate deosebiri calitative, modificări relevante fiind remarcate numai pentru cantitatea proteinelor PR, care s-a dovedit a fi dependentă de vulnerabilitatea tulpinii virale [364].

Sunt cunoscute mai multe familii de proteine PR clasificate în baza succesivității aminoacidice, nucleotidice ale ADN_c și însușirilor antigenice. Conform unor date la cele 13 familii de proteine PR descrise primar sunt raportate și proteinele PR-14 (proteinele transportoare de lipide), precum și PR-15, PR-16 și PR-17 [476]. Rolul tuturor tipurilor de proteine PR rămâne a fi neelucidat. Proteinele PR cu activitate peroxidazică (tipul PR-9) sau ribonucleazică (tipul PR-10) se consideră a fi implicate în protecția antivirală, iar β -1,3-gluconaza, proteinazele ar favoriza realizarea procesului infecțios [476].

Replicarea acidului nucleic viral și al componentilor virali este realizată prin cooperarea genomului viral și al plantei gazdă, care în majoritatea cazurilor este asociată cu procesele de

inhibare a expresiei genelor proprii ale gazdei, blocarea transportului nucleo-plasmatic, sinteza proteinelor proprii ale celulei gazdă, precum și perturbarea transportului vezicular intracelular.

Efecte genetice provocate de infecțiile virale. Efecte genetice provocate de virusuri sunt descrise la diferite plante de cultură [77; 301; 437]. Rezultatele prezentate relatează modificări ale procesului de repartiție a materialului genetic între celulele fiice, formare a microsporilor. Încă în a. 1966 Dollinger E., estimând efectele induse de virusul piticirii rugoase a porumbului, constată drept cauză a acestora posibilele însușiri mutagene ale virusului [citată după 148]. Mottinger J. și coaut. [309], studiind gena alcooldehidrogenaza (ADH) la *Zea mays* la infectarea acestuia cu virusul mozaicului dungat al orzului (VMDO), stabilesc inserția unui segment de la 3 până la 5 kilobaze. Autorii explică efectul constatat prin supoziția, că infecția virală a indus un "stres citogenomic". Mai cunoscute în acest sens sunt fenomenul *abberant ratio* descris la porumb, descrierea aneuploizilor la orz și grâu în cazul infectării cu VMDO [261; 361]. În baza efectelor genetice pe care le provoacă VMDO, a fost elaborată o metodă netradițională de mărire a variabilității genetice la grâul de primăvară [453]. Interesul sporit față de VMDO se datorează răspândirii extinse a patogenului în toate zonele cultivate de cereale, daunelor păgubitoare, dar și impactului virusului asupra manifestării unor caractere calitative la porumb [76], și decurgerii procesului de mitoză la orz și grâu [261; 361]. Este cunoscută pătrunderea în polen (celulele vegetale și spermale) la unele genotipuri de orz [191], prin care se încearcă explicarea repercusiunilor provocate de agentul viral.

Studiile recente indică, că interacțiunile dintre plante și agenții patogeni se bazează pe mecanisme epigenetice [112; 222; 345]. Conform Boyko A., Kovalchuk I. [73], infectarea unei gazde sensibile cu un virus compatibil rezultă cu activarea diferitelor semnale cum ar fi inducerea ARNsi. Aceste semnale se extind sistemic de la locul de infecție spre țesuturile neinfectate, inclusiv țesuturile organelor generative. Infectarea este însoțită de hipo- sau hipermetilarea *site*-urilor specifice, schimbări de natură epigenetică ce pot fi transmise descendenților.

Efecte genetice ale patogenezei virale sunt descrise și pentru virusurile animalelor. Pentru reprezentanții unor familii ADNdc, precum *Papovaviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae*, este raportată integrarea materialului genetic viral în genomul gazdei. Pe măsura aprofundării cercetărilor moleculare aplicate în virologie, datele cu referire la inserția genomului viral în cel al gazdei se extind. Astfel, în urma aplicării tehnicii de amplificare specifică a fragmentelor de ADN, a fost dovedită integrarea ADN virusului coriomeningitei limfocitare (retrovirus) în celulele splinei șoricilor, celule caracterizate printr-o reacție acută la patogenul dat

[234]. Acest fenomen a fost descris atât în condiții *in vivo*, cât și *in vitro*, în timp ce în alte tipuri de celule sau gazde (porc, maimuțe, om) nu a fost constatată o situație similară. Lavia P. și coaut. [251] prezintă date privitor la destabilizarea genomului, proces ce poate contribui la o selecție rapidă a populațiilor celulare în timpul progresiei tumorale capabile să depășească infecțiile virale.

Integrarea completă sau parțială a genomului viral în cel al gazdei este constatată pentru adenovirusuri, unele virusuri oncogene [30]. În cazul inserției nu se realizează replicarea ADN viral, nu se constată asamblarea particulelor virale și transportarea lor extracelulară. Celula gazdă păstrează funcțiile specifice ei, iar în cazul diviziunilor celulare, ADN viral integrat poate fi transmis celulelor fiice, ceea ce generează transformări neoplastice și modificări ale mecanismelor de control ale proliferărilor celulare. Ca rezultat al unor asemenea stări poate fi inducerea diviziunilor celulare necontrolate.

Modelul teoretic ce demonstrează integrarea ADN-lui plasmidei în cromozomul bacterian de *Lactococcus lactis* elaborat de Campbell în 1984 este aprobat și pentru virusurile plantelor cu capacitate de a se însera în genomul gazdei [201]. Conform algoritmului propus pentru realizarea integrării este necesară forma inelară bispiralată a ADN-ului. În locul contactului ADN-ului viral ciclic cu ADN-ul gazdei se produc rupturi și unirea moleculelor de ADN. Un rol important în realizarea cu succes al acestui proces le revine succesiunilor terminale ce posedă însușiri specifice pentru integrare.

Variația somaclonală sub influența infecțiilor virale. În biotehnologiile vegetale culturile *in vitro* se aplică cu succes în calitate de generator al variabilității genetice de interes practic. Cultura *in vitro*, ca sursă de variabilitate somaclonală, are la bază influența factorilor genetici (natura explantului, aberațiile cromozomale), epigenetici, precum și condițiilor de cultivare [250]. Frecvența variațiilor somaclonale pentru același genotip și tip de explant poate fi variată în dependență de componența mediului, durata de subcultivare. Orice modificări genetice (aneuploidie, poliploidie, rearanjamente structurale ale ADN-ului) pot genera variante somaclonale apte de a fi transmise ereditar [346; 389]. În scopul extinderii spectrului de variabilitate indusă, cultura *in vitro* este utilizată pe larg în complex cu tehnici de mutagenезă experimentală (chimică, fizică, biologică) [249]. Un interes deosebit prezintă studiul impactului infecțiilor virale în sisteme *in vitro*. Aplicarea virusurilor în acest scop este puțin studiată și este limitată la lucrările Laboratorului Biotehnologii vegetale, IGFPP [17; 29]. Utilizarea infecțiilor virale (virusul Y și M al cartofului) în asociere cu cultura *in vitro*, au contribuit la lărgirea spectrului variațiilor somaclonale atestate la regeneranții

primari și descendenții acestora la cartof. Rezultatele analizelor proteinogramelor au demonstrat că variabilitatea somaclonelor și a formelor inițiale este determinată, în mare măsură, de genotip și de prezența virusurilor în țesuturile plantelor donatoare de explante [388].

Este stabilit, că capacitatea de regenerare este controlată genetic, însumând interacțiunea factorilor genetici nucleari și citoplasmatici [378]. Regenerarea *in vitro* include nu doar inițierea și proliferarea celulară, ci și cito- și histodiferențierea urmate de formarea structurilor morfogene. Studiul inducerii variabilității somaclonale pe fondalul infecțiilor virale va permite extinderea cunoștințelor privitor la patogeniza virală, precum și procesele proliferative *in vitro*.

1.4. Proliferarea celulară și factorii inductori ai diversității genetice

Cunoașterea particularităților și controlului diviziunilor celulare la eucariote, inclusiv plante, a cunoscut realizări semnificative în ultimele decenii. Înțelegerea modului în care diferite componente celulare interacionează, realizând procesul unic de reproducere și distribuire a materialului genetic, indică multiple elemente și etape conservate pentru celulele organismelor cu diferit nivel de organizare (drojdii, plante, animale). Unele elemente cheie ale diviziunilor celulare identificate la plantele superioare s-au dovedit a fi omoloage levurilor sau animalelor.

Estimarea particularităților proliferării celulelor vegetale, cuprinde multiple aspecte privitor la reacția plantelor față de diverși factori [464], celulele aflate în reproducere sunt elemente ce reacționează rapid și activ la factorii endo- și exogeni [460]. Conservatismul proceselor proliferative asigură posibilitatea utilizării diferiților parametri ai diviziunilor celulare în studiile de monitoring.

Meioza și semnificația ei în asigurarea stabilității și variabilității genetice. Meioza reprezintă un eveniment crucial în ontogeneza plantelor cu înmulțire sexuată, constituit din două diviziuni succesive precedate de o singură rundă a replicării materialului genetic. În timp ce diviziunea a doua cuprinde segregarea cromozomilor, proces similar celui realizat în mitoză, în cadrul primei se desfășoară momente unice ce au la bază conjugarea cromozomilor omologi și schimbul de gene ce cuprind în ansamblu: (i) inițierea; (ii) recunoașterea și conjugarea; (iii) formarea sinapsei cromozomale; (iv) recombinarea [55].

Destinația meiozei este de a realiza două probleme majore: menținerea stabilității genomului și crearea unei diversități genetice, la realizarea cărora un loc important îl deține conjugarea cromozomilor omologi și recombinarea. În funcție de gradul de condensare a cromozomilor omologi

și realizarea complexului sinaptonemal se succed etapele meiozei, caracteristica căreia este prezentată în multiple analize bibliografice [182; 303; 322]. Pentru desfășurarea normală a meiozei au fost descrise mai multe gene ce determină timpul desfășurării, interacțiunea dintre cromozomii omologi, realizarea structurilor specifice acestui proces [259; 227; 415]. Către anul 2000, prin metode clasice au fost descrise circa 200 gene specifice meiozei și gametogenezei [342]. Prin tehnica *microarrays* au fost identificate peste 1500 gene ce influențează expresia genelor, dintre care cca 300 specifice meiozei și 600 sporulării și gametogenezei [40; 94], precum și alte câteva mii de gene ce funcționează simultan, cu efect de stimulare sau inhibare a celor specifice etapelor meiozei.

În vederea evaluării complete a meiozei, conform Roeder G. [354], evenimentele desfășurate în profaza I trebuie divizate în două subetape distincte. Prima subetapă, ține de alinierea segmentelor omoloage, dar fără realizarea conjugării, cea de-a doua referindu-se la conjugarea regiunilor omoloage, formarea complexului sinaptonemal și realizarea *crosing-over*-ului meiotic. Recombinarea meiotică este un proces complex, constituit din multiple faze ce implică reorganizarea cromatinei, conjugarea cromozomilor și schimbul de fragmente ale catenelor de ADN [37; 423].

Controlul genetic al recombinării între cromozomii omologi. În ultimele decenii au fost obținute succese considerabile în studiul mecanismelor recombinării meiotice și reglarea acestui proces. Pe exemplul a mai multor obiecte de studiu a fost descris și identificat un șir de gene antrenate în desfășurarea recombinării, stabilite etapele de includere a lor, interacțiunea lor cu alți factori [37; 227; 259; 322]. În lucrările expuse de către Anderson L., Stack S. [37] este prezentat un studiu detaliat al genelor antrenate în diferite procese meiotice la plante, ce includ conjugarea cromozomilor omologi, formarea complexului sinaptonemal, schimbul de gene, precum și segregarea cromozomilor. În general, este demonstrat, că genele antrenate în reglarea recombinării meiotice sunt conservative, fiind stabilită o înaltă omologie pentru diferite organisme, care admit totodată și unele posibile abateri [372] (Tabelul 1).

Un moment important în demararea procesului de meioză îi revine asocierii presinaptice a cromozomilor omologi [184; 442]. În vederea elucidării particularităților conjugării presinaptice și a conjugării cromozomilor omologi se aplică mai multe procedee genetice și citogenetice. Prin tehnica FISH a fost evidențiată asocierea telomerelor, iar în unele cazuri și a centromerilor cu membranele nucleare [54; 64] cu formarea așa numitelor buchete.

Tabelul 1. Omologia și descrierea genelor asociate recombinării meiotice (după [372] cu completări)

Drojii, mamifere	Gene omoloage la plante	Speciae	Descriere la plante	Funcție	Referințe bibliografice
SPO11	AtSPO11-1	<i>A. thaliana</i>	Corespunde genei Spo-11.	Induce rupturi dublu catenare (RDC).	Hartung, Puchta, 2000
	AtSPO11-2 și 3	<i>A. thaliana</i>	Nou descrisă.	Interacționează cu subunitatea B a TOP6.	Hartung, Puchta, 2001
MRE11	AtMRE11	<i>A. thaliana</i>	O copie.	Complexul MRE11 și RAD50 prin intermediul SPO11 realizează procesarea RDC; modifică compactizarea cromatinei.	Hartung, Puchta, 1999 Gallego et al., 2001 Grelon et al., 2001
XRS2	-		Neidentificată la plante.		
RAD50	AtRAD50	<i>A. thaliana</i>	O copie.		
DMC1	AtDMC1 LIM15 OsDMC1 RiLIM15A și B HvDMC1 PSH1	<i>A. thaliana</i> <i>L. longiflorum</i> <i>Oryza sativa</i> <i>O. sativa</i> <i>Zea mays</i> <i>H. vulgare</i> <i>Zea mays</i>	Două familii de gene. Similară la drojdii.	Omoloagă genei Rad 51. Generează formarea joncțiunilor hibride și asocierea cu nodulii recombinogeni (NR).	Couteau et al ., 1999 Ding et al ., 2001 Kathiresan et al., 2002 Klimyuk et al., 2000 Klimyuk et al., 1997 Pawlowski et al., 2004 Shimazu et al ., 2001
MND1	At MND1	<i>A. thaliana</i> <i>O. sativa</i> <i>A. thaliana</i>	Au fost izolate două sub-unități (la om, fluturi), trei la ciuperci.	Antrenată în atașarea la ADN a complexelor proteice. Responsabilă pentru replicarea, repararea și recombinarea AND-ului.	Gerton, DeRisi, 2002 Ishibashi et al ., 2001
RPA				Activarea inițierii reparării ADN în mitoză și destruiților în meioză. Component al NR.	Garcia et al., 2000
ATM					
RECQ HELICASES		<i>A. thaliana</i>	Omologie cu cromozomii sexuali.	Se activează la etapele finale a reparării RDC, probabil asociat cu structura <i>Holliday</i> . Asociat cu CS și colocalizat cu Rad51/Dmc1 și Rpa.	Hartung et al ., 2000
MSH4,MSH5	MSH2, MSH3, MSH6, MSH7	<i>A. thaliana</i>	MutS-asociată cu familia <i>Mismatch</i> .	Se activează la etapele finale ale recombinării; condiționează formarea și interferența <i>cross-over</i> -ilor.	Culligan, Hays, 1997 Culligan, Hays, 2000
MLH1	AtMLH1	<i>A. thaliana</i>	Omologie cu MutL.	Interacționează cu Mlh3 în generarea <i>cross-over</i> -ilor.	Jean et al., 1999
REC8/RAD21	DIF1/SYN1	<i>A. thaliana</i>	Familie mică de gene responsabilă de coeziune. Prezintă o omologie joasă cu genele la drojdii.	Necesară pentru condensarea cromozomilor și coeziunea cromatidelor surori în mitoză; condensarea și conjugarea cromozomilor în meioză.	Bhatt et al., 1999 Dong et al., 2001
HOP1	ASY1 și 2	<i>A. thaliana</i>	Similaritate la nivelul aminoacizilor.	Asyl este asociată cu cromatina în proximitatea CS.	Caryl et al., 2000 Armstrong et al., 2002

Pe exemplul porumbului (*Zea mays*) este descris rolul genei PAM1 în formarea buchetului de cromozomi în profaza I meiotică [161]. Mutația *psh1*, stabilită de asemenea la porumb, cauzează frânarea reparării rupturilor ADN-ului dublu catenare, inducând asinapsia, dar fără a influența formarea buchetului de cromozomi [338]. Gena AHP2, descrisă la arabidopsis, și stabilită omoloagă cu HOP2 la *Saccharomyces cerevisiae* HOP2 [254] și *S. pombe* MEU13 [314], este cunoscută drept reglatoare a conjugării cromozomilor, iar mutația ei induce fragmentarea cromozomilor și segregarea lor neechivalentă [259]. Mutația acestei gene provoacă diverse alterări, cum ar fi fragmentarea cromozomilor și segregarea neechilibrată a cromozomilor [370]. Tot la arabidopsis sunt descrise genele SYN1/DIF1 [62] și SWI1 [292] necesare unei distribuiri stricte a cromozomilor între celulele fiice. Inhibarea sau deleția ambelor gene cauzează segregarea precoce și fragmentarea cromozomilor în meioză. Coeziunea presinaptică a cromozomilor omologi poate fi afectată și de rupturile dublu catenare [270], influențând formarea complexului sinaptonemal și în cele din urmă - recombinația meiotică [165].

Gena PAIR1 la orez (*Oryza sativa* ssp. *japonica*, $2n = 24$) este implicată în inducerea sterilității feminine și masculine, rezultate în urma destabilizării formării bivalenților [322]. Mutația genei *pair1* este urmată de abateri în formarea fusului de diviziune și sporulare. În formarea sinapselor la orez a fost identificată și gena PAIR2, găsită ortoloagă genei HOP1 la *S.cerevisiae* și ASY1 la arabidopsis [53].

Procesul de conjugare al cromozomilor omologi se produce în profaza meiotică, fiind asociat evenimentului de formare a sinapselor și de condensare a cromozomilor. Mecanismele responsabile de realizarea sinapselor rămâne a fi discutabilă. Pe exemplul multor organisme, inclusiv a plantelor și vertebratelor, a fost demonstrat rolul telomerelor în realizarea proceselor de conjugare a cromozomilor omologi [259]. S-a stabilit, că mutațiile ce cuprind regiunile telometice diminuează esențial frecvența recombinației meiotice [354].

Formarea complexului sinaptonemal este legat direct de procesul de inducere și reparare a rupturilor ADN dublu catenare, proces catalizat de SPO11 prin asistența unui număr extins de produși ai altor gene [184; 227; 250]. Pentru ciupercile pluricelulare, fluturi, viermi, precum și plante, mamifere a fost stabilit un înalt conservatism în inducerea acestui proces [227].

La etapa de inițiere a sinapselor se remarcă apariția unor corpusculi elipsoidali de-a lungul elementelor centrale (nodulii timpurii) [37]. Funcția acestor structuri este asociată cu recunoașterea și alinierea segmentelor omoloage, constituind locul localizării complexului proteic RAD51-p/DMC1-p, RAP-p și ATM-p. Majoritatea nodulilor timpurii disociază la mijlocul pachitenului, mai departe perpetuind doar cei implicați în schimburile reciproce, aceștea

din urmă fiind denumiți noduli tardivi. Numărul și localizarea lor este asociată cu chiasmele [302; 442]. Primele relatări despre chiasme se constată la Janssens F. în lucrările publicate în anii 1909, 1924 [239]. Actualmente, frecvența chiasmelor per celulă și poziția lor sunt considerate parametri citogenetici eficienți în aprecierea *crossing-over*-ului și a recombinării meiotice [57]. Frecvența chiasmelor per celulă relevă numărul de *cross-over*e realizate, iar distribuția lor per bivalent - locul realizării schimburilor cromatinice [204; 213]. Imai H. și coaut. [204] postulează, că chiasmele interstițiale în diachineză sunt distribuite aleatoriu și aproape uniform pe toată lungimea bivalentului cu excepția regiunilor centromerice și telomerice. Autorii consideră, că frecvența chiasmelor depinde direct de numărul de cromozomi și este un parametru specific, adaptat pe durata evoluției speciei.

În condiții convenționale, este necesar cel puțin un schimb per bivalent, ceea ce ar permite conjugarea și separarea echivalentă a cromozomilor. Numărul și locul realizării *crossing-over*-ului sunt limitate de interferența genelor [303]. Se consideră, că frecvența și distribuția chiasmelor sunt genetic determinate, deținând valori diferite pentru indivizii masculini și feminini [242].

Gradul de condensare al cromatinei și organizarea structurală a cromozomilor joacă un rol determinant în aprecierea locului realizării *crossing-over*-ului. În rezultatul evaluării frecvenței recombinării la diferite organisme, Anderson L. and Stack S. [37] au stabilit, că lungimea totală a SC în pachiten corelează cu mărimea genomului cu excepția drojdiilor pentru care au fost remarcate 100 *cross-over*e la 10 Mbp și 29 mm CS ($2n=32$), comparativ cu 10 *cross-over*e per 180 Mb și 145 mm CS la arabidopsis ($2n=10$) și 40 *cross-over*e per 17 330 Mbp și 1475 mm CS la grâu ($2n=42$).

În general, chiasmele sunt mai frecvente în zonele eucromatinice, cu gene active și mai reduse în heterocromatină ce conține secvențe repetitive. La drojdii recombinarea se produc preferențial în regiunea promotorului și corelează și activitatea ADN-azei [427], acestea fiind considerate *site*-uri fierbinți [65]. În general, *site*-urile recombinogeme fierbinți corespund regiunilor cu conținut sporit de CG și a profilurilor transcripționale, în timp ce regiunile telomerice și centromerice se caracterizează printr-un număr redus de *cross-over*e [154; 233].

La arabidopsis, Fransz P. și coaut. [142] constată *site*-uri recombinogene fierbinți aferente cromatinei decondensate, iar în regiunea centromerilor supresia recombinării [175]. Date similare au fost remarcate și pentru porumb [433].

Pentru diverse organisme este stabilit rolul heterocromatinei centromerice în asigurarea coeziunii cromatidelor surori [326]. Totodată, rolul acestor regiuni în formarea chiasmelor este discutabilă. Navas-Castillo J. și coaut. [316] punctează, că fluctuația cantității de

heterocromatină influențează redistribuirea chiasmelor, iar Suja J. și coaut. [395] raportează, că distribuția chiasmelor de-a lungul bivalențior este independentă de natura segmentului (heterocromatină/eucromatină).

Torrezan R. și Pogliarini M. [405] au demonstrat, că frecvența chiasmelor și terminalizarea lor poate fi afectată de multipli factori precum gradul de compactizare al cromatinei, rearanjamentele structurale. Astfel, autorii menționează o creștere a frecvenței chiasmelor, îndeosebi a celor interstițiale, în diploten și reducerea lor în diachineză ca consecință a sporirii heterocromatinei, sugerând ideia deplasării chiasmelor localizate în zonele eucromatice spre sectoarele de heterocromatină, acestea din urmă servind drept barieră pentru terminalizarea lor. Ulterior, supoziția terminalizării chiasmelor a fost combătută și prin rezultatele expuse de Ata A. și coaut. [57], Wada M. și Imai H. [418], conform cărora așa numitele chiasme terminale reprezintă asociații achiasmatică a regiunilor telomerice ce dețin rol prioritar în disjuncția bivalenților în anafază. Date similare în susținerea confirmării lipsei terminalizării chiasmelor este expusă și de Mezard C. [293]. Astfel, în studiile citogenetice, numărul și localizarea chiasmelor sunt considerate indici relevanți în aprecierea valorică a *crossing-over*-ului și analiza recombinării meiotice.

Recombinarea somatică – sursă de generare a variabilității genetice la plante.

Genomul plantelor se caracterizează printr-un conținut înalt de secvențe de ADN repetate în tandem, care constituie o precondiție pentru recombinarea somatică ce are la bază schimburile între cromatidele surori (SCS, *Sister Chromatid Exchange*). SCS sunt frecvent stabilite în procesul de examinare a diviziunilor mitotice la mai multe organisme și pentru diverse situații patologice. Conform datelor unor autori SCS se pot produce cu o frecvență redusă și spontan [247]. Majoritatea cercetătorilor susțin opinia expusă de către Wolff S. și coaut. [425], conform căreia formarea SCS este legată de procesele de sinteză ale ADN-ului. Cert este stabilit, că cauza formării SCS sunt rupturile bicatenare nereparate la momentul replicării ADN-ului [224], precum și de abaterile procesului de reparație a acestor rupturi [209; 321]. Geneza SCS este condiționată de momentele de replicare ale ADN-ului și anume de formarea furcilor replicative, momente în care poate avea loc recombinarea între cromatidele surori. Conform modelului replicativ de formare a SCS propus de Painter R. [330], repararea rupturilor bicatenare produse la hotarele a două clastere de repliconi decurge asincron. O asemenea situație poate fi generată de o viteză diferită a procesului de replicare, precum și de modificările structurale în molecula de ADN.

Conform modelului clasic de reparare a rupturilor dublu catenare ale ADN-ului în procesul replicării reparative, între catenele cu aceeași orientare are loc formarea legăturilor covalente cu formarea structurii *Holliday* [124]. Formarea legăturilor covalente poate fi urmată

sau nu de procesul de recombinare. Modelul dat este mai frecvent constatat în cazul reparării meiotice, cu toate că poate fi aplicat și pentru mitoză, inclusiv la plante. Rezultatul unei asemenea reparatii poate fi înalt mutagenic, dacă în procesul de recombinare vor fi antrenate consecutivități nealele. Conform modelului SDSA (*Synthesis-Dependent Strand Annealing*), în calitate de matriță pentru reparare sunt antrenate succesiunile omoloage ale cromatidei surori, cromozomilor omologi sau succesiuni din alte poziții ale genomului. Rezultatul reparării nu are efect mutagenic, dacă în reparație sunt antrenate succesiunile omoloage ale cromatidei surori, în celelalte cazuri reparația derivând cu conversii. Experimental, a fost stabilit, că SDSA prezintă calea esențială de reparare mitotică la eucariote.

Pentru supraviețuirea celulelor în cazul rupturilor dublu catenare, în molecula de ADN pentru celulele atât procariote, cât și eucariote, inclusiv la plante, este descrisă calea de reparație recombinativă. Reparația recombinativă este, de asemenea, un mijloc de restabilire a legăturilor intra- și intercatenare, precum și a rupturilor monocatenare. Modelul SSA (*Single Strand Annealing*) explică reparația în sectoarele repetate în tandem și este întotdeauna urmat de pierderi de informație genetică din cauza delețiilor sectoarelor intermediare dintre sectoarele omoloage antrenate în reparație.

Pentru evidențierea frecvenței și distribuției SCS, în studiile citogenetice se aplică colorația diferențială a ADN-ului bazată pe utilizarea 5-brom 2-deoxiuridinei (BrdU) pe parcursul a trei diviziuni succesive, conform căreia se evidenșiază în a doua și a treia diviziune SCS produse în același locus (Figura 1.3).

În baza aplicării acestui protocol a fost constatat, că mitomicina C, razele ultraviolete, etilmetansulfonatul, radiațiile ionizante cauzează formarea de SCS în limfocitele umane în condiții *in vitro*, cu o frecvență majoră ce se păstrează pe parcursul a câtorva generații, dar care nu se produc în același locus [103].

Пелевина И. și coaut. [481] au remarcat menținerea unui procent înalt al SCS pe parcursul a 16 generații în cultura de celule inițial iradiate. Conform autorilor, SCS erau atestate în aceleași loci, totodată pe parcursul generațiilor puteau fi evidențiate celule cu o rată sporită de SCS neevidențiate în liniile celulare neiradiate. În urma analizei SCS în liniile celulelor de hârciog expuse razelor gama în doza de 3Gy, Кудряшова О. și Жлоба А. [472] susțin, că schimburile între cromatide se formează pe parcursul a trei generații succesive în aceleași loci. Totodată, în prima generație a variantei cu iradiere, autorii constată celule cu multiple SCS care lipsesc la martor și în următoarele generații. Autorii concluzionează, că aceste celule sunt eliminate în diviziunile ulterioare.

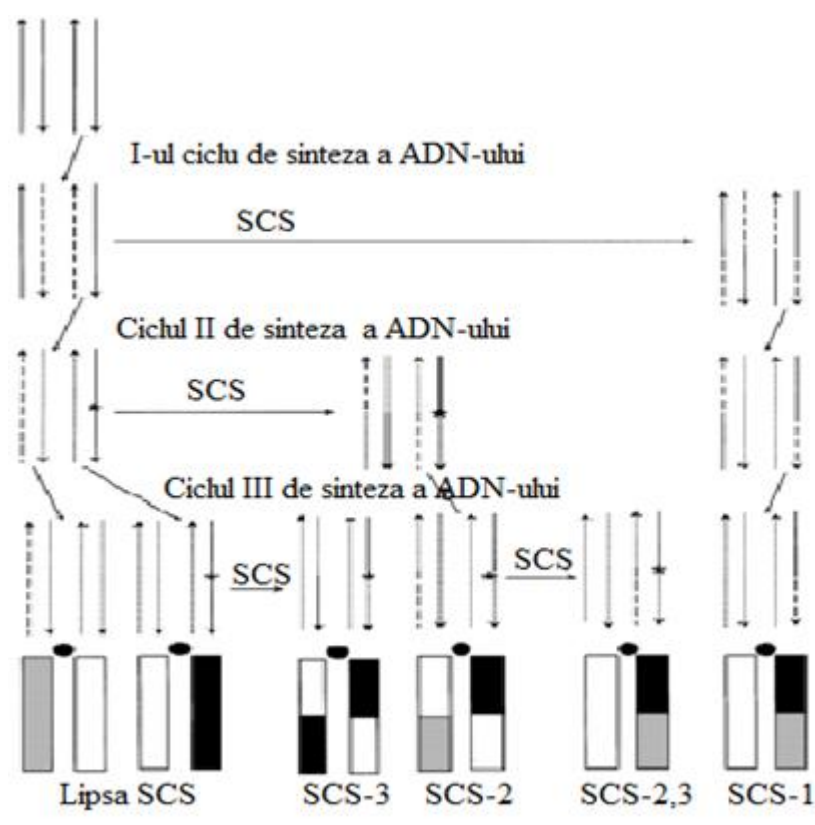


Fig. 1.3. Schema de încorporare a BrdU cu formare de SCS pe parcursul a trei diviziuni celulare succesive (după [353]).

Se consideră, că rata SCS corelează direct cu mărimea genomului [356]. Raposo A. și coaut. [347], în urma unor analize cantitative ale ADN-ului și numărului de SCS la porumb indică că în medie un schimb cromatidic revine la aproximativ 0,9 pg de ADN. De asemenea, autorii remarcă, că distribuția SCS este dependentă de lungimea brațului cromozomal.

Se consideră, că în formarea SCS nu se admit erori, iar în timpul realizării schimburilor reciproce nu se produc alterări structurale adiționale. Grație conservatismului proceselor ce stau la baza formării SCS, procedeul dat este utilizat pe larg drept un test al genotoxicității [130], fiind aplicat în evaluarea efectului mutagen al diferiților compuși atât la plante, cât și la animale. În urma studiului influenței unui șir de diverse substanțe (etanolului, oxidului de crom, benzosulfamidei de sodiu, fluorouracilului, acidului ascorbic) în inducerea SCS la plante (*Vicia faba*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*), în limfociti umani și celulele splinei la șoricea au fost constatate tendințe similare în efectele stabilite, indiferent de obiectul studiat [441]. Conform autorilor, în scopul studierii efectului genotoxic al diferitelor preparate, tehnica de evidențiere a

SCS la plante este mai simplistă și este recomandă utilizarea plantelor în calitate de obiecte-test în stabilirea toxicității substanțelor.

Amestecul dintre bisulfitul și sulfitul de sodiu induce majorarea frecvenței SCS și a micronucleelor la orz. În concentrații majore (0,5-30,0 μM) dioxidul de sulf inhibă activitatea mitotică și proliferarea celulelor. În concentrații reduse (0,1 μM) acest compus poate stimula creșterea rădăcioarelor la orz [434]. De asemenea la orz, s-a stabilit, că acidul ascorbic, mitomicina C, adriamicina și hidrazinul maleic majorează frecvența SCS. S-a stabilit, că acest efect poate fi inhibat de compușii sulfhidrici, așa ca cisteina și glutatationul [436]. Autorii au stabilit o corelație directă între cantitatea de radicali liberi produși de compușii utilizați și frecvența SCS.

Studiile de toxicitate au demonstrat, că arsenul conținut în apele potabile din Zimapan, Hidalgo, Mexico induce majorări esențiale ale frecvenței SCS la bob ($p < 0,001$) [162]. Autorii au stabilit o dependență directă între rata SCS și concentrația arsenului. De asemenea seleniul, sub formă de selenit de sodiu, în concentrații de la 0,01 până la 10,0 mg/l cauzează creșterea frecvenței micronucleelor de 1,9-3,9 ori și de 1,5-1,6 a SCS la bob [435].

Deoxinucleotidele trifosfat modifică rata SCS în radiculele de orz și bob, stabilind un efect dependent de doză [430]. dATP induce micșorarea frecvenței SCS, în timp ce dGTP provoacă majorarea SCS la ambele specii studiate. Autorii remarcă specificitatea tratării cu dCTP precum și dTTP. Conform efectului indus ambii compuși majorează frecvența SCS la orz, și o reduc la *Vicia faba*. Pentru ambele specii s-a stabilit, că efectul înregistrat pentru dGTP poate fi redresat prin aplicarea celorlalte deoxinucleotidelor trifosfat (dATP, dCTP sau dTTP). Tratarea plantelor cu amestec în proporții egale de deoxinucleotide trifosfat nu generează apariția de SCS. Autorul sugerează ideea, că fluctuațiile în coraportul acestor compuși poate fi o cauză a apariției SCS la plante.

De asemenea s-a studiat efectul produs de 10 aminoacizi asupra frecvenței SCS în limfocitele de om și 6 la plantele de orz. Rezultatele obținute au demonstrat, că alanina, fenilalanina, glicina, valina, histidina, lizina și serina induc majorarea SCS în limfocite, în timp ce treonina, izoleucina, lizina și arginina nu condiționează formarea de SCS. Prin utilizarea orzului ca test-sistemă a fost confirmată calitatea de inductori ai SCS pentru aceiași aminoacizi, cu excepția lizinei. Autorii remarcă însușirile inhibitoare ale lizinei în inducerea de SCS [441].

Sporirea frecvenței SCS în cazul infecțiilor virale este demonstrată pentru virusurile B și C ale hepatitei în limfocitele pacienților cu ciroză [408]. Sporirea SCS și indicele mitotic scăzut, conform autorilor, reflecta efectul genotoxic al acestor virusuri.

În pofida multitudinii studiilor în acest domeniu, mecanismul de formare a SCS nu este stabilit definitiv. Se consideră, că livrarea SCS depinde de inducerea de rupturi duble în catena de ADN, dereglarea procesului de reparare a rupturilor și replicare a ADN-ului, precum și de degradarea activității ADN-polimerazei, iar numărul SCS este un parametru utilizat cu succes în studiile de toxicologie și mutagenză [205]. În această direcție plantele constituie obiecte eficiente de studiu în aprecierea gradului de poluare a mediului înconjurător, potențialului mutagen al diferiților factori, având ca criterii indici ai diviziunilor mitotice – frecvența aberațiilor cromozomale, schimburile între cromatidele surori [32].

Cercetările din domeniu demonstrează clar, că creșterea și dezvoltarea plantelor sunt determinate de multiple interacțiuni dinamice a factorilor ereditari cu cei de mediu, conducând la formarea matricei structurale și bazei funcționale a organismelor (ADN, ARN, proteine, metaboliți, organite, celule, țesuturi, organe, etc.) [21]. Conform autorilor o prioritate strategică a științelor biologice moderne reprezintă investigațiile sistemice, axate pe identificarea conexiunilor la diferite niveluri de organizare a materiei vii, precum și elucidarea unor noi aspecte moleculare ale fenomenelor biologice generale. Pentru identificarea bazei genetico-moleculare a rezistenței este important selectarea elementelor implicate în crearea reacțiilor de răspuns (gene, familii de gene, markeri moleculari) și se impune adoptarea unor abordări integrative axate pe cuantificarea acestor factori [20].

Concluzii la Capitolul 1

Din literatura de specialitate se constată cunoașterea bazelor genetice ale interacțiunii gazdă-patogen pentru plantele de cultură și agenții fungici sau organisme dăunătoare [19; 22; 20; 24; 25]. Efectul micozelor asupra plantelor de cultură este determinat de capacitatea de interacțiune a plantei-gazdă cu patogenul, adică de capacitatea de a forma fitopatosisteme, iar ponderea înaltă a genotipului în aceste relații oferă posibilități de creare a formelor rezistente pe cale genetică [18].

Totalizând informațiile bibliografice se constată lipsa datelor privitor la aspectele citogenetice ale patogenezei virale, precum și evidenierea influenței virusurilor asupra descendenților plantelor infectate.

Complexitatea procesului de patogeneză virală determină **importanța studiului comparativ al sistemelor gazdă-patogen** formate în baza virusurilor cu diferite tipuri de genomuri (ADN, ARN), precum și mecanisme de replicare (citoplasmatică, nucleară) în dependență de tipul reacției genotipului gazdei (susceptibilitate, toleranță).

În contextul constatărilor bibliografice au fost formulate **obiectivele cercetării:**

- **studiul structural, citogenetic** al modificărilor induse de infecțiile virale în țesuturi compatibile procesului infecțios (organe vegetative și reproductive), celule necompatibile pentru germenii virali (microspori) la plantele de cultură (orz, tomate, varză) infectate cu virusuri ARN sau ADN;
- **evaluarea variabilității genetice la plantele infectate și descendenții** obținuți în condiții de patogeneză virală.

Interpretarea sistemică a rezultatelor va permite **estimarea mecanismelor implicate în procesul de patogeneză virală**; **aprecierea rolului infecțiilor virale în generarea variabilității genetice**.

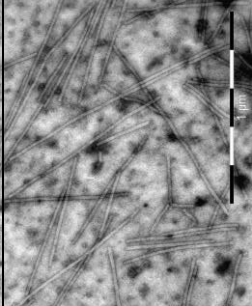
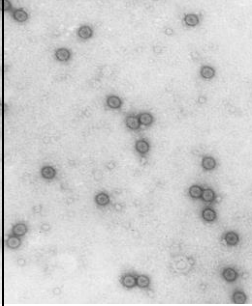
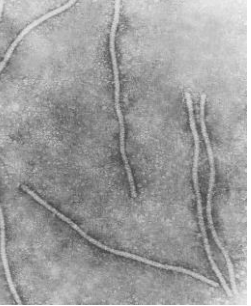
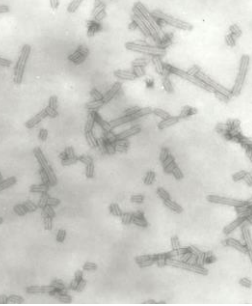
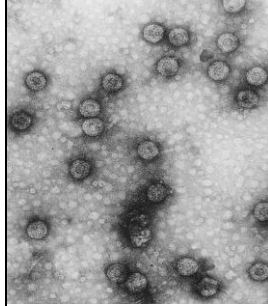
2. CARACTERISTICA MATERIALULUI BIOLOGIC ȘI METODELOR DE CERCETARE

2.1. Materialul și metodologia cercetării

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 ce asigură reproducerea și propagarea sistemică a infecției virale în organismul plantei.

Materialul biologic de studiu. În calitate de material biologic au servit genotipuri de tomate, orz și varză (soiuri, varietăți spontane) ce au prezentat sensibilitate (susceptibilitate sau toleranță) la agenți virali ADN sau ARN constituenți pentru care transmiterea verticală (prin semințe sau polen) a virionilor nu a fost înregistrată (Tabelul 2.1).

Tabelul 2.1. Sistemele gazdă-patogen antrenate în cercetare

Virusuri ARN				Virus ADN
Virusul mozaicului tutunului (VMT) , liniar, lungimea particulelor 300nm.	Virusul aspermiei tomatelor (VAT) , sferic, diametrul particulelor 30nm.	Virusul X al cartofului (VXC) , filamentos, lungimea particulelor 750nm.	Virusul mozaicului dungat al orzului (VMDO) , particule liniare, rigide eterogene (108-111, 125-128, 148 nm).	Virusul mozaicului conopidei (VMCo) , sferic, diametrul particulelor cca 50 nm.
				
Genotipuri gazdă				
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.): - soiurile Fachel, Nistru, Prizior, Elvira, - soiurile cu gene de rezistență la VMT Craigella (Tm-1/Tm1) și Craigella (Tm-2 ² /Tm-2 ²), - specia spontană <i>S. pimpinellifolium</i> L., varietatea <i>S. pimpinellifolium</i> var. <i>racemigerum</i> .			Orz de primăvară (<i>Hordeum vulgare</i> L.): - soiurile Galactic, Sonor, Unirea.	Varză albă (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.): - s. Iuniscaia, Slava, Amagher, Haricovscaia, Podaroc și Moldavanca. Conopida (<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> L.).

În scopul evidențierii particularităților structurale și funcționale cauzate de infecțiile virale la plantele infectate și descendenții lor au fost utilizate specii autogame (tomate, orz). Pentru asigurarea autopolenizării stricte, butonașele florale și spicele au fost izolate la fazele premeiotice, iar fructele și boabele formate au fost utilizate în studiul formelor descendente.

Cercetările structurale au fost realizate la nivelul țesuturilor și celulelor compatibile procesului infecțios (organe vegetative și reproductive), celulelor incompatibile pentru germenii virali (microspori) la plantele de tomate și orz infectate cu diferite virusuri ARN (Figura 2.1.).

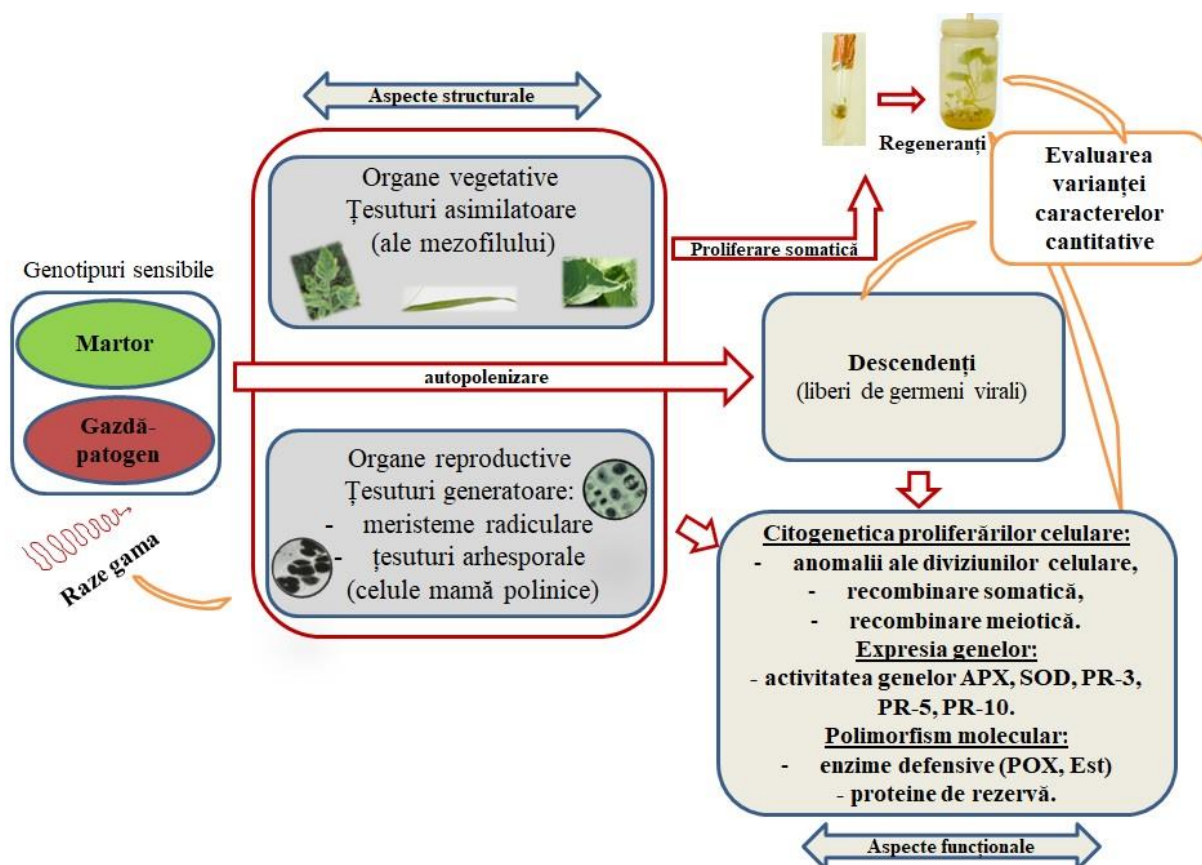


Fig. 2.1. Schema metodologică a cercetărilor (originală).

Impactul infecțiilor virale (ARN și ADN) asupra proceselor proliferative a fost realizat la nivelul țesuturilor generatoare (celule ale meristemelor radiculare, celule arhesporale), precum și a țesuturilor calusale (celule somatice aflate în diviziune activă și diferențiere).

Pentru aprecierea efectului genetic al infecțiilor virale au fost realizate studii comparative ale acțiunii razelor gama – factor mutagenic fizic pentru care este cunoscut mecanismul de acțiune asupra sistemelor biologice (țesuturi, celule).

2.1.1. Caracteristica taxonilor de plante antrenate în cercetare

Tomatele (*Solanum lycopersicum* L., sinomin *Lycopersicon esculentum* Mill., $2n=24$) au fost reprezentate prin soiurile Prizior, Fachel, Nistru, Elvira, soiurile deținătoare de gene de rezistență la VMT: Craigella ($Tm-2^2/Tm-2^2$) și Craigella ($Tm-1/Tm-1$), specia spontană *S. pimpinellifolium* L. și varietatea *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum*.

Soiurile Prizior, Fachel, Nistru și Elvira, Craigella ($Tm-1/Tm-1$) se caracterizează prin tip de creștere determinat, specia spontană *S. pimpinellifolium* L. și varietatea *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum* – semi-indeterminat, iar Craigella ($Tm-2^2/Tm-2^2$) – indeterminat. La soiuri tipul de inflorescență reprezintă un racem tipic, iar la speciile spontane inflorescența este o cimă scorpioidă cu diferit grad de ramificare.

Specia *S. pimpinellifolium* L. – se caracterizează printr-o rezistență relativă la fuzarioză, verticilioză, toleranță la VMT. Deține conținut major de substane uscate, caroten, zaharuri, toleranță la temperaturi extremale [391].

Varietatea *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum* (sinomin *L. esculentum* var. *racemigerum* (L.) Miller) se distinge printr-un grad redus de atac cu fuzarioză, alternarioză, septorioză, precum și VMT [391].

Soiurile Craigella ($Tm-2^2/Tm-2^2$) și Craigella ($Tm-1/Tm-1$) se disting prin deținerea genelor de rezistență la VMT. Gena *Tm1* a fost identificată la *S. hirsutum*, este localizată pe cromozomul 2 și determină blocarea replicării ARN-ului viral. Gena $Tm-2^2$ descrisă la *S. peruvianum*, este situată în apropierea centromerului cromozomului 7 și conferă rezistență la propagarea virusului din celulă în celulă [248].

În cercetare au fost utilizate trei soiuri de **orz de primăvară** (*Hordeum vulgare* L., $2n=14$): Sonor, Unirea și Galactic. Conform mai multor autori, orzul este un obiect model eficient în studiile citogenetice, aprecierea genotoxicității diferiților factori [434]. Genomul orzului este descris complet, cromozomii fiind notați prin simbolul H de la 1 la 7 ($1H \div 7H$). Este o specie autogamă în majoritatea condițiilor climatice și, prin urmare, soiurile sunt, de obicei, fenotipic și genetic uniforme. Soiurile incluse în cercetare sunt de primăvară, dețin spice cu două rânduri, la care numai spiculețul central este fertil.

Soiurile Sonor și Galactic au fost create la IP Institutul de Cercetări pentru Culturile de Câmp „Selecția”, Bălți, sunt omologate pentru cultivare în zona de Nord și Centru a Republicii Moldova cu destinație furajeră și pentru bere.

În scopul evaluării citopatologiilor provocate de virusurile ADN componente, în cercetare au fost incluse genotipuri de **varză**, germoplasmă cu sensibilitate la VMCo.

Drept material biologic au servit șase soiuri de varză albă (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.): Iuniscaia (timpuriu), Slava (mediu), Amagher (tardiv), Haricovscaia (tardiv), Podaroc (tardiv), Moldavanca (tardiv), un genotip de conopidă (*B. oleracea* var. *botrytis* L.) dovedite sensibile față de VMCo.

2.1.2. Particularitățile agenților virali studiați

Virusul aspermiei tomatelor (En. *Tomato Aspermy Virus*, TAV). Face parte din genul *Cucumovirus*. Conform datelor descriptive VAT deține o răspândire largă, având capacitatea de a infecta peste 100 specii din 24 familii de dicotiledonate și 3 monocotiledonate. Majoritatea plantelor gazdă pentru VAT se referă la familiile *Chenopodiaceae*, *Compositae* și *Solanaceae* [193].

Virionii VAT pot fi propagați de peste 10 specii de afide, iar transmiterea prin semințe este descrisă numai pentru *Stellaria media* a izolatului din *Campanula rapunculoides*.

Severitatea simptomelor cauzate este determinată în mare măsură de izolatul virusului, unul dintre cel mai agresiv fiind considerat cel al crizantemelor.

Tomatele infectate cu VAT sunt recunoscute după simptomele macrostructurale, exprimate prin retardare în creștere, aspectul tufos, colorație antocianică, lăstarii superiori practic nu fructifică, iar fructele formate sunt mici, deformate, cu mezoderm petrificat și cu puține semințe. În dependență de faza de infectare, sensibilitatea soiului, tulpina virusului și condițiile climatice, pagubele provocate pot constitui peste 65% din recoltă.

Virusul X al cartofului (En. *Potato Virus X*, PVX), reprezentant al genului *Potexvirus*, infectează 240 specii din 16 familii, în special *Solanaceae*. Propagarea prin semințe a acestui patogen nu este descrisă, însă virionii se transmit facil mecanic și cu ajutorul insectelor, fiind cunoscute ca vectori mai multe zeci de specii de afide.

Genomul viral este reprezentat de o moleculă ARN monocatenară formată din 6435 nucleotide. Aproximativ 94% din masa moleculară a particulei o constituie componenta proteică alcătuită din 1270 subunități identice [196].

Simptomele macroscopice cauzate la tomate de VXC deseori pot fi confundate cu cele produse de VMT sau VYC (virusul Y al cartofului, genul *Potexvirus*), fapt ce indică necesitatea realizării diagnosticului virusologic pentru identificarea agentului cauzal. Plantele de tomate infectate manifestă simptome variate în dependență de soi, condiții de cultivare și se

caracterizează prin decolorare slabă și difuză a țesuturilor internervuriene, prezentând un mozaic verde-gălbui.

Viroza provocată de VXC este deosebit de accentuată în cazul infecțiilor mixte (împreună cu VMT, VYC), care sunt frecvente în condiții de câmp.

Virusul mozaicului tutunului (En. *Tobacco Mosaic Virus*, TMV), reprezentant al genului *Tobamovirus*. VMT infectează 199 specii din 30 familii. Virusul se transmite ușor mecanic, cu ajutorul vectorilor, plantelor parazite. Nu este descrisă transmiterea prin semințe sau polen. La tomate, VMT poate fi depistat pe suprafața semințelor, cauzând infectarea embrionului în timpul germinării [197].

VMT se propagă cu ușurință mecanic prin contactul dintre plante, frunze și prin rănilor ce apar la efectuarea lucrărilor de întreținere a culturilor. Sursă de infecție o constituie solul, inventarul de lucru, resturile de după recoltare a plantelor bolnave (rădăcini, tulpini, frunze).

La tomate provoacă clorozări ale limbului frunzelor, care se pot masca la temperaturi mai înalte de +28°C. Atacul acestui virus se întâlnește în culturile de câmp, sere și solarii, influențând negativ dimensiunile, numărul și calitatea fructelor. Pierderile de recoltă, cauzate de mozaicul tomatelor pot ajunge la 30-40%. Simptomele provocate de VMT, prin care se manifestă această viroză variază mult, în dependență de tulpina virusului, soiul plantei, faza de vegetație, condițiile de mediu. La genotipurile analizate în cazul mozaicului pe foliole apar pete verzui gălbui, care alternează cu porțiuni de culoare verde marmorată, limbul foliar este ușor încrețit, de formă neregulată. Plantele infectate au o creștere încetinită. Impactul asupra calității și cantității recoltei este mai puțin evident comparativ cu cel produs de VAT sau VXC.

Virusul mozaicului dungat al orzului (En. *Barley Stripe Mosaic Virus*, BSMV), reprezentant al genului *Hordeivirus*, este un virus tripartit cu genom multipartit, ARN component. Sunt cunoscute 41 specii din 3 familii, ce reprezintă gazde susceptibile pentru VMDO. În dependență de soi, la orz se poate propaga prin semințe în proporție de 90-100% [192]. Particulele virusului sunt depistate în frunze, teacă, tulpina, rădăcinile plantelor infectate. Virionii VMDO sunt constatați în celule epidermei, mezofilului, floemului, xilemului [211]. În celulele aflate în diviziune mitotică VMDO a fost descris printre microtubulii fusului de diviziune, influențând activitatea normală a aparatului de diviziune celulară.

Virusul mozaicului conopidei (En. *Cauliflower Mosaic Virus*, CaMV) este reprezentant al genului *Caulimovirus* ce include virusuri ADN dublu catenare, replicarea genomului cărora implică transcriptaza inversă. Majoritatea speciilor gazdă se referă la fam. *Brassicaceae*, dar sunt descrise tulpini care pot infecta sistemic și unele specii din fam. *Solanaceae* (genurile *Datura* și *Nicotiana*). VMCo se propagă în mod nepersistent cu ajutorul unor specii de insecte, în deosebi

Myzus persicae, dar și prin infectare mecanică [195]. Genomul VMCo constituie o moleculă circulară de ADN ce deține 8,0 kbaze. În baza genomului VMCo este construit vectorul ce deține promotorul 35S VMCo, care se utilizează pe larg în lucrările de transformare genetică [341].

În ciclul vital al VMCo este antrenată transcriptaza inversă, enzimă implicată în transcrierea ARN-ului în ADN, similar retrovirusurilor animalelor [340].

VMCo este răspândit în toate țările cu climă temperată, atacul fiind de până la 75%. Cu toate acestea, în literatura de specialitate lipseau date privitor la identificarea acestui patogen în condițiile Republicii Moldova.

Prin aplicarea procedurii de contrastare negativă [187] la unele plante de varză albă, cultivate în câmp deschis, și laur (*Datura stramonium*), specie ce prezintă gazdă naturală pentru VMCo, au fost vizualizate particule sferice, opace în mărime de aproximativ 50 nm. Conform rezultatelor testării imunomicroscopice [296] și analizei ELISA (trusa de diagnostic SANOFI DIAGNOSTICS Pasteur) VMCo a fost identificat la varza albă (*B. oleracea* var. *capitata*), ulterior varză roșie (*B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra*), conopidă (*B. oleracea* var. *botrytis*), nap turcesc (*B. rapa rapifera*), ridiche (*Raphanus sativus*) ca rezultat al infectării naturale. Virionii VMCo au fost depistați solitar în plantă sau în complex cu alți germeni virali (preponderent virusuri filamentoase). Plantele de laur purtătoare de germeni virali dețineau modificări macrostructurale profunde în deosebi la nivelul componentelor sferei reproductive (petale, sepale, ovar). Izolatul din laur a putut fi ușor transmis prin infectare mecanică la diferiți taxonii de *Brassicaceae*.

Plantele de conopidă infectate mecanic cu VMCo au manifestat clarifierea nervurilor, clorozarea sectoarelor internervuriene și benzi lungi de-a lungul nervurilor. În stadiile mai avansate ale bolii pe frunze apar pete necrotice. La varza albă simptomele virozei se dezvoltă sub formă de mozaic, iar la etapele avansate de dezvoltare se constată pete mici inelare (Figura A.1.4.). Gradul de expresie al simptomelor este influențat de soi și condițiile de mediu.

2.1.3. Condițiile de cercetare

Cercetările incluse în teză au fost desfășurate în Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor în perioada 1994-2018.

Experiențele au fost montate în condiții de solarii, câmp și laborator (Laboratorul Biotehnologii Vegetale). În seră plantele au fost cultivate în lizimetre sau în substrat sol, menținând condiții similare pentru variantele experimentale și martor.

Planificarea experiențelor în câmp a fost efectuată în variante randomizate în trei repetiții conform recomandărilor Доспехов Б. [461].

Metodele de studiu ale aspectelor citogenetice a patogenezei virale au fost selectate ținând cont de specificitatea fiecărui sistem gazdă-patogen și particularitățile biologice ale taxonilor.

2.2. Metode virusologice de diagnostic și studiu al agenților virali

2.2.1. Metoda de inoculare mecanică a plantelor experimentale

Toate cercetările au fost realizate pe plante infectate mecanic cu extract vegetal proaspăt obținut din plante infectate natural cu agenți virali. Ca sursă primară pentru VAT au servit plantele de crizantemă, VMT – tutun, VXC – cartof, VMCo – varză, VMDO – orz, cu simptome specifice fiecărui agent viral, natura cărora a fost confirmată prin metode de diagnostic (metoda contrastării negative, metoda imunosorbentă).

Plantele de tomate au fost infectate în faza de 3-4 frunzulițe, cele de orz – 2-3 frunze, iar de varză în faza de 2 cotiledoane.

Materialul vegetal ce a servit ca sursă de infecție a fost prelevat de la plante tinere, cu simptome bine exprimate, diagnosticate infectate cu virusurile corespunzătoare. Frunzulițele mărunțite mecanic au fost macerate în piulițe în soluție tampon fosfat (pH 7,4). Cu un tampon de vată, înmuiat în soluția de macerat, se trece, prin presare ușoară, pe suprafața frunzulițelor pulverizare cu praf de carbură de siliciu pentru producerea rănilor superficiale. Procedura de infectare a fost mimată și în variante martor, utilizând în acest scop soluția de tampon fosfat. Infectarea a fost repetată la 3-4 zile. Identificarea plantelor bolnave a fost realizată prin metoda contrastării negative la 10-15 zile după infectarea mecanică. În studiile ulterioare au fost utilizate numai plantele depistate purtătoare de germeni virali, care au format varianta experimentală „virus” și cele lipsite de particule virale din varianta infectată cu soluție tampon ce a servit drept „martor”.

2.2.2. Metoda de contrastare negativă bazată pe microscopia electronică prin transmisie

Pentru depistarea plantelor infectate și celor sănătoase s-a folosit tehnica de diagnostic virusologic: metoda de contrastare negativă [187]. În acest scop au fost utilizate diferite tipuri de țesuturi de la plantele analizate (fragmente de limb foliar, sepale, antere, semințe) din care a fost obținută prin macerare în apă distilată o masă omogenă. Maceratul se aplică pe o grilă microscopică cu peliculă de formvar sau colodiu. După contrastare cu soluție apoasă de acetat de uraniu 1%, preparatele au fost examinate în microscopul electronic prin transmisie EM 125 K.

2.2.3. Metoda imunoenzimatică

(ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Pentru identificarea unor agenți virali cum ar fi VAT și VMCo a fost aplicată metoda imunoenzimatică. Aceasta a fost motivat prin faptul, că spectrul gazdelor VAT este asemănător cu cel al Virusului Mozaicului Castraveților (VMC). De asemenea, particulele acestor virusuri, examinate prin procedeul contrastării negative, prezintă un aspect morfologic asemănător (particule izodiametrice cu diametrul de cca 30 nm). Este important să menționăm, că în literatura de specialitate lipsesc careva date privitor la identificarea VMCo în condițiile Republicii Moldova, acesta fiind descris în țările vecine.

Pentru identificarea acestor patogeni au fost utilizate truse de diagnostic SANOFI DIAGNOSTICS Pasteur.

Obținerea extractului vegetal, aplicarea anticorpilor și a probelor în microplanșete au fost realizate conform procedurii propus de Clark M., Adams A. [96]. Rezultatul reacției enzimaticice a fost apreciat după intensitatea reacției cromatice.

2.3. Metode de inducere și studiu ale variabilității genetice

2.3.1. Metoda culturii *in vitro*

Metoda culturii *in vitro* este un procedeu sigur de inducere a polimorfismul genetic, având la bază variabilitatea somaclonală [155; 389]. Factorii inductori ai variabilității somaclonale pot fi de natură genetică (aberații structurale cromozomale: deleții, transpoziții sau inversii, mutații genomice: aneuploidii, poliploidii sau mixoploidii, mutații genice) [249], epigenetică (metilări ale ADN-ului) [217], precum și mutații ale genomului citoplasmatic al AND-ului cloroplastelor și mitocondriilor.

În vederea evaluării impactului infecției virale în inducerea variabilității somaclonale ca material biologic au servit cinci soiuri de varză albă (Amagher, Haricovscaia, Iuniscaia, Slava și Podaroc) și soiul de conopidă Zavadovschii, infectate cu VMCo. Astfel, în scopul inducerii culturii *in vitro*, de la plante testate purtătoare de germeni virali au fost selectate explante de pețiol, frunză de aproximativ 1 mm³ din zone histologice similare cu simptome unimorfe (sectoare clarifiate, enații, sectoare hipercromatice), care au fost în continuare sterilizate și inoculate în eprubete cu mediu nutritiv. Explantele variantei martor au fost supuse unei proceduri similare. Inițial au fost tatonate opt variante a mediului nutritiv Murashige, Skoog [312] cu suplimentări de vitamine și hormoni (Tabelul 2.2).

Tabelul 2.2. Compoziția de bază a mediilor nutritive pentru inducerea calusogenezei din fragmente de mezofil

Compoziția mediului	MS (Murashige, Skoog, 1962)	Compoziția mediului	MS (Murashige, Skoog, 1962)
	Cantitatea, mg/l		Cantitatea, mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0,25
KNO ₃	1900	CuSO ₄ *5 H ₂ O	0,025
CaCl ₂ *2H ₂ O	440	CoCl ₂ *6 H ₂ O	0,025
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	Na ₂ EDTA	37,3
KH ₂ PO ₄	170	FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8
(NH ₄) ₂ SO ₄ *H ₂ O	-	Vitamine:	
KI	0,83	Inositol	100
H ₃ BO ₃	6,2	Glicina	2
MnSO ₄ *4 H ₂ O	22,3	Tiamina HCl	0,1
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	8,6	Piridoxin HCl	0,5
		Acid nicotinic	0,5

Optim pentru calusogeneză s-a dovedit a fi cel suplimentat cu BA (0,5 mg/l), ANA (0,5 mg/l), chinetină (0,01 mg/l). În toate variantele de medii nutritive utilizate, drept sursă de carbon a servit zaharoza (20 g/l), iar pentru solidificarea mediului s-a folosit agarul (7 g/l). Explantele au fost incubate la întuneric la temperatura de 25±2°C pentru inițierea calusurilor, apoi transferate în încăperi cu un fotoperiodism de 16/8 ore, temperatură 25±2°C și iluminare de 2000 lx. Evaluarea calusogenezei a fost efectuată pe parcursul a patru luni.

Menținerea calusurilor s-a realizat pe medii MS suplimentate cu BA (0,5 mg/l), ANA (0,5 mg/l) pe parcursul a 4-5 subcultivări realizate la fiecare 2-3 săptămâni. Calusurile morfogene au fost cultivate pe același mediu nutritiv. Plantulele cu 2-3 frunzulițe și o lungime de 5-7 cm au fost transferate pe mediu de înrădăcinare MS (½ macro- și microelemente), lipsit de hormoni.

Pe parcursul subcultivărilor *in vitro* a fost evaluată perioada de inițiere a calusogenezei și morfogenezei, apreciat aspectul și consistența calusului, estimați următorii indici: explante cultivate pe mediu; explante cu răspuns calusogenetic pozitiv; frecvența calusogenezei (numărul explantelor cu răspuns/numărul total de explante x 100%); numărul calusurilor morfogene; frecvența morfogenezei (numărul explantelor cu răspuns morfogen/numărul total cu răspuns x 100%). A fost calculată eficiența morfogenezei, ce constituie cota din calusurile subcultivate, intensitatea regenerării, reieșind din numărul de plante per calus regenerativ.

2.3.2. Metoda mutagenezei experimentale

Una din cele mai aplicabile metode de inducere de forme noi în cadrul soiurilor este mutageneza experimentală. Tradițional, în calitate de inductori sunt utilizați diverși factori fizici și chimici.

Razele gama, aplicate pe larg ca factori mutageni, datorită efectelor produse asupra organismelor vii, se referă la radiațiile ionizante. Expunerea unui sistem biologic la radiații gama implică două tipuri de efecte: directe și indirecte. Influența directă invocă formarea speciilor radioactive de oxigen în urma radiolizei apei. Radicalii liberi rezultați în urma interacțiunii razelor cu moleculele organismelor vii induc modificări fiziologice, biochimice, structurale [169]. Pe de altă parte, efectele indirecte ale radiațiilor afectează ADN celulelor. În funcție de doză se produc restructurări cromozomale și genomice [136; 411]. Grație efectelor genetice, razele gama sunt aplicate pe larg în ameliorarea plantelor de cultură. Actualmente, din cca 2570 forme mutante vegetale 1023 sunt obținute prin utilizarea radiațiilor ionizante [34].

În cercetările noastre au fost aplicate razele gama. În acest scop a fost folosită instalația RXM-γ-20, unde în calitate de sursă radioactivă a servit elementul Co⁶⁰.

Este cunoscut, că în funcție de doza de radiație primită și sensibilitatea organismului, efectele produse de razele gama pot fi diferite. În corespundere cu datele din literatura de specialitate, au fost selectate dozele pentru iradierea semințelor de orz și plantulelor de tomate.

Iradierii au fost supuse soiurile de orz de primăvară Galactic, Sonor și Unirea. Pentru aceasta, jumătate din totalul de semințe incluse în experiență (nu mai puțin de 500 semințe pentru fiecare soi) au fost iradiate cu raze gama în doza de 100 Gy, 150 Gy sau 250 Gy. După două zile de repaus toate semințele au fost sădite în câmp conform standardelor agrotehnice.

Evidența comparativă a influenței VAT, VXC și a razelor gama asupra proceselor meiotice a fost analizată la soiurile de tomate Prizior și Fachel. După depistarea virionilor virali în antere, lăstarii cu butonașe în faza premeiotică au fost excizați și iradiați cu raze gama în doza de 20 Gy. La atingerea fazei meiotice (faza a VI-a a ontogenezei, ceea ce corespunde perioadei de desfășurare a micro- și macrosporogenezei) butonașele au fost recoltate și fixate pentru analizele citologice conform metodei descrise mai jos (subcapitolul 2.4.3).

2.4. Metode citogenetice de studiu

2.4.1. Microscopie electronică prin transmisie

Pentru evaluarea ultrastructurii celulelor plantelor sănătoase și infectate cu virusuri a fost aplicată tehnica microscopiei electronice prin transmisie. În acest scop fragmente de țesuturi vegetale (limb foliar, antere) au fost fixate în aldehydă glutarică de 2%, pregătită în baza soluției

tampon cacodilat (pH 7,2), timp de 4 ore și postfixare în soluție de tetraoxid de osmiu 2% pe durata a 2 ore, după deshidratare în soluții de etanol în concentrație crescândă piesele au fost plasate în soluție de oxid de propilenă. Deshidratarea a fost urmată de impregnarea în amestecul de oxid de propilenă și rășini epoxide în raportul 3:1, 1:1 și 1:3. Incluzionarea a fost realizată în amestecul de rășini epoxidice (DDSA, MNA și Epon 812). Secțiunile ultrafine, obținute la ultramicrotomul UMT-4 (Sumî, Ucraina) și LKB UM III (Suedia), au fost contrastate în soluție de acetat de uranil 2% și citrat de plumb, ulterior examinate în microscopul electronic prin transmisie EM 125K sau JEM 100SX.

2.4.2. Metoda citologică de examinare a mitozei

Studiul diviziunilor mitotice a fost realizat pe preparate temporare după metoda clasică (Пайшева, 1988). Semințele soiurilor de orz au fost etalate pentru germinare pe discuri din hârtie de filtru în cutii Petri în exces de apă. După perioada de incubare specifică, determinată prin cercetări preventive, vârfurile radiculelor au fost fixate în amestecul alcool etilic: acid acetic glacial (3:1). După 12-24 ore fixatorul a fost înlăturat, iar materialul biologic – spălat cu alcool etilic de 70° în două repetări, fiecare a câte 15-20 minute. Pentru studiul citologic a fost utilizată metoda *squash* de obținere a preparatelor temporare. Masele celulare au fost colorate cu carmină acetică timp de 2-3 ore. Pentru aceasta, cu ajutorul unui bisturiu se selectează doar vârful meristematic al radiclei. Ulterior materialul a fost acoperit cu o lamelă și strivit atent. Diferențierea a fost realizată cu acid acetic de 45%. Preparatele au fost studiate la microscopul EUROMEX FE 2025.

Preparatele obținute au fost utilizate pentru evaluarea valorii indicelui mitotic, precum și pentru studierea spectrului și ratei aberațiilor cromozomale în mitoză.

Activitatea mitotică, reprezentată prin indicele mitotic, a fost calculat aplicând următoarea formulă:

$$IM = (N_P + N_M + N_A + N_T / N_I + N_P + N_M + N_A + N_T) \times 100\% , \text{ unde} \quad (2.1)$$

N_P – numărul celulelor profazice,

N_M – numărul celulelor metafazice,

N_A – numărul celulelor anafazice,

N_T – numărul celulelor telofazice,

N_I – numărul celulelor interfazice.

În celulele aflate în anafază sau telofază a fost evaluat spectrul și frecvența aberațiilor cromozomale.

Pentru aprecierea indicelui mitotic, spectrului și frecvenței aberațiilor cromozomale au fost evaluate nu mai puțin de 200 celule în trei repetiții.

2.4.3. Metoda citologică de examinare a meiozei. Pentru examinarea meiozei au fost utilizate anterele din mugurii floralii aflați în faza meiotică (pentru tomate faza de butonizare, lungimea anterelor de cca 1-2 mm), sau spiculețe de orz (faza de burduf, lungimea anterelor cca 1mm) au fost fixate în amestecul alcool etilic: acid acetic glacial (3:1). După 12-24 ore fixatorul a fost înlăturat, probele biologice spălate în alcool etilic de 70° ulterior în apă distilată timp de 20-30 minute în două-trei repetări. În scopul asigurării unei colorări mai eficace, s-a aplicat prelucrarea cu mordant (alaun de fier de 8% timp de 40-60 minute). Pentru studiul citologic au fost utilizate frotiuri colorate prin tehnica regresivă cu carmină acetică. Diferențierea colorării s-a efectuat cu acid acetic de 45%. În cazul reperării profazei I meiotice, și anume a diachinezei timpurii s-a realizat studiul numărului și tipului bivalenților, parametri utilizați în evaluarea recombinării meiotice. Preparatele temporare au fost examinate în microscopul optic BIOLAR.

Tipul bivalenților a fost estimat conform configurației în dependență de poziția coeziunii sinaptice între brațele cromatidice. Din punct de vedere citogenetic, configurația bivalenților permite evaluarea *crossing-over*-ului meiotic. În corespundere cu locul realizării lui se constată formarea chiasmelor care se consideră a fi expresia citologică a *crossing-over*-ului, iar numărul și distribuția lor reflectă locul și gradul recombinării meiotice.

Conform numărului și poziției chiasmelor în diachineză, bivalenții au fost clasificați în grupe: 1 interstițială (I), 2 interstițiale (II), 1 terminală (T), 1 interstițială +1 terminală (I+T), 1 terminală + 2 interstițiale (T + II), 2 terminale (TT), 2 terminale + 1 interstițială (TT+I), univalenți (0) [203] (Figurile 2.2 și 2.3).

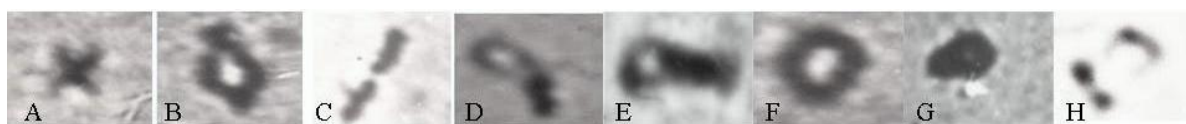


Fig. 2.2. Reprezentarea diferitelor tipuri de bivalenți la tomate (*S. lycopersicum* L.):
A) bivalent cu o chiasmă interstițială; B) bivalent cu două chiasme interstițiale; C) bivalent cu o chiasmă terminală; D) bivalent cu o chiasmă terminală și una interstițială; E) bivalent cu o chiasmă terminală și două interstițiale; F) bivalent cu două chiasme terminale; G) bivalent cu două chiasme terminale și una interstițială; H) univalenți (x 1500).

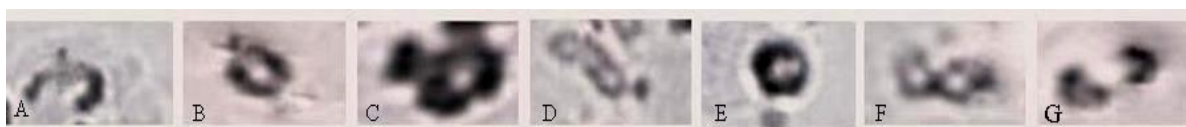


Fig. 2.3. Reprezentarea diferitelor tipuri de bivalenți la orz (*H. vulgare* L.):
A) bivalent cu o chiasmă interstițială; B) bivalent cu două chiasme interstițiale; C) bivalent cu o chiasmă terminală și una interstițială; D) bivalent cu o chiasmă terminală și trei interstițiale; E) bivalent cu două chiasme terminale; F) bivalent cu două chiasme terminale și una interstițială; G) univalenți (x 1500).

Totodată s-au calculat suma chiasmelor interstițiale (SI), suma chiasmelor terminale (ST) și suma totală a chiasmelor (S) la o celulă mamă a polenului (CMP).

Aberațiile cromozomale (procentul total, precum și spectrul lor) au fost apreciate în anafaza – telofaza I sau II.

Un alt indice citologic de evaluare a regularității proceselor meiotice a constituit evidența frecvenței tetradelor după tipul monade, diade, triade, tetrade sau poliade.

Distribuția și tipul chiasmelor a fost apreciată în baza a cel puțin 60 CMP aflate în diachineza. Spectrul și procentul aberațiilor meiotice, tipul tetradelor au fost estimate pentru fiecare fază meiotică pe cel puțin 300 CMP în trei repetiții.

2.4.4. Evidența schimburilor între cromatidele surori

Pentru studierea recombinării mitotice a fost aplicată metoda analizei frecvenței schimburilor între cromatidele surori (SCS) în cromozomii mitotici din meristemele radiculare, bazată pe încorporarea diferențiată a segmentelor cromatidice cu 5-brom 2-deoxiuridină (BrdU). În acest scop, semințele variantelor cercetate au fost germinate la întuneric până la atingerea lungimii radiculelor de 2-3 cm. Incorporarea BrdU a fost realizată pe parcursul a două cicluri celulare prin etalare pe discuri expuse în amestec de 100 μ M BrdU, 0,1 μ M FdUrd și 5 μ M Urd [333]. Schema de fixare, macerare și colorare a materialului a fost selectată după [401]. Numărul și poziția schimburilor cromatidice per cromozom au fost apreciate conform colorației diferențiate (Figura 2.4).



Fig. 2.4. 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).

2.4.5. Reacția histochimică de determinare a localizării α -tomatinei. Studiul localizării α -tomatinei a fost realizat pe secțiuni semifine native a pețiolilor de tomate. Pentru identificarea granulelor de alcaloid a fost aplicată colorarea diferențiată cu soluția Dragendorff formată din azotat de bismut și iodură de potasiu.

2.5. Metode biochimice de studiu

2.5.1. Evaluarea polimorfismului peroxidazelor și esterazelor. Polimorfismul enzimatic a fost apreciat în plantule juvenile de orz (2-4 frunzulițe) crescute din boabe obținute în condiții de câmp, de la variantele experimentale cu aplicare a infecției virale separat și complementar radiației gama.

Metoda electroforetică de determinare a polimorfismului peroxidazelor și esterazelor a fost realizată conform [397]. Pentru extracție a fost utilizată soluția tampon ce conține Tris-HCl, clorură de magneziu și zaharoză, pH 8,3. Pentru pregătirea extractului, materialul vegetal (fragmente de limb foliar) a fost macerat în soluție tampon (0,1 M) în raportul 2:1 și centrifugat timp de 15 min la 8000 rot/min. Electroforeza a fost desfășurată în plăci verticale în gel de poliacrilamidă la curent continuu de 20 mA timp de 4-6 ore.

Pentru peroxidază, gelurile au fost colorate în soluție tampon de acetat (pH 4,6) suplimentată cu benzidină R (0,2%) și peroxid de hidrogen (10%), iar pentru esterază – în amestecul de α și β naftilacetat. Pentru vizualizarea profilurilor esterazei, gelurile au fost plasate la întuneric pentru 4-8 ore, iar după incubare au fost fixate în acid acetic de 7% pentru 2 minute.

Mobilitatea relativă a izoformelor (R_f) a fost calculată după linia în gel, conform formulei $R_f = r_i \cdot R^{-1}$, unde r_i este distanța de la start până la poziția izoformei, iar R – distanța de la start până la linia de ieșire creată de bromfenol.

Activitatea peroxidazei și polifenoloxidazei a fost determinată spectrofotometric în extracte proaspete ale țesuturilor mezofiliene [462].

2.5.2. Analiza electroforetică a hordeinelor. Cariopsele mature, uscate au fost decorticate, măcinate mărunt până la făină. Pentru fiecare variantă a fost luată randomizat câte o probă medie din cca 25 semințe din fiecare repetiție. Extracția a fost realizată în soluție alcoolică de 80° timp de 3,5 ore conform [118]. Electroforeza a fost desfășurată în geluri verticale poliacrilamidice cu dodecilsulfat de sodiu (SDS-PAGE) de 12,5% după Shewry P. și coaut. [379] la curent continuu de 20 mA. După fixare în acid acetic de izopropanol - acid acetic - apă distilată (1:1:8), gelurile au fost colorate în *Coomasie blue* R-250. Drept markeri moleculari au servit proteinele standard a setului Fermentas SMO061 (170; 130; 95; 72 (roșu); 55; 43; 34; 26; 17; 10 (verde). După spălarea gelurilor pentru decolorarea fonului, au fost descrise densitogramele spectrelor electroforetice cu ajutorul densitometrului SOFT LASER (modelul SL-2D/1D UV/VIS - SUA).

2.5.3. Metode de determinare a substanțelor uscate, acidității și conținutului de zahăr

Conținutul substanțelor uscate în frunzele de varză a fost determinat prin metoda uscării în etuvă conform [462, p. 25]. Probele vegetale au fost uscate la $103\pm 2^{\circ}\text{C}$ timp de 4-4,5 ore: după răcire într-un exsicator au fost cântărite și procedura de uscare repetată în aceleași condiții pentru 1,5-2 ore, iar după răcire în exsicator – recântărite. Procedura de uscare și cântărire a fost repetată până la obținerea unor date constante.

Cantitatea de apă (Q) din probă a fost calculată după formula:

$$Q = m - m_1 / m_2 * 100\%, \text{ unde} \quad (2.2)$$

m – masa flaconului cu probă, g;

m_1 – masa flaconului cu probă după uscare, g;

m_2 – cantitatea de produs luată pentru analiză, g.

Substanța totală uscată a fost calculată prin diferență, folosind următoarea relație:

$$\text{S.U.T. (\%)} = 100 - Q (\%) \quad (2.3)$$

Cantitatea de substanțe uscate în fructele de tomate a fost calculată prin metoda refractometrică. În acest scop a fost utilizat suc proaspăt pregătit prin omogenizarea mezocarpului fructelor coapte conform recomandărilor [462, p. 26]. Indicele de refracție a fost determinat în trei repetiții, ținând cont de temperatura din încăpere.

Conținutul substanțelor uscate solubile a fost calculat după formula:

$$\text{Substanță uscată (\%)} = I - m_1 / m, \text{ unde}$$

I – valoarea indicelui de refracție citită pe scara refractometrului,

m_1 – masa omogenizatului, g

m – masa probei luate pentru determinare, g.

Procentul de substanță uscată a fost apreciat corespunzător tabelului indicelui de refracție [462, p. 27]. În calcul a fost luată media aritmetică a trei determinări, ținând cont de temperatura din încăpere.

Aceleași probe au servit și pentru aprecierea acidității totale prin metoda de titrare în baza recomandărilor după Ермаков А. и др. [462]. Conținutul zaharurilor a fost determinat refractometric după Плешков Б. [483]. Toate analizele au fost efectuate în 5-6 repetiții.

2.6. Analiza expresiei genelor prin Real-Time PCR (qPCR)

Materialul biologic. Expresia genelor asociate stresului oxidativ și procesului de patogeneză a fost evaluată în plantulele de orz obținute de la organisme infectate cu VMDO și

descendenții lor. Plantulele de orz au fost crescute în vase de plastic în amestec de sol, turbă și nisip (câte trei vase a câte 6 plante pentru fiecare variantă). Pentru controlul condițiilor de cultivare vasele au fost plasate în camera climatică (Sanyo chamber). Materialul vegetal pentru analiză (0,3 – 0,5 g din partea medie a frunzulițelor tinere) a fost colectat la etapa de 3 frunze, congelat și stocat în azot lichid la -80°C.

Extragerea ARN-ului. Extragerea ARN-ului s-a efectuat utilizând *TRI Reagent* (AM9738, *Applied Biosystems*) conform protocolului propus de producător. Cantitatea și calitatea ARN-ului a fost estimată spectrofotometric (λ 260/280 nm) și prin electroforeza în condiții denaturante în gel de agaroză 1,4% cu soluție tampon MOPS-formaldehidă.

Reacțiile de revers-transcripție au fost realizate pe ARN-ul total (600ng) tratat preliminar cu *RQ1 DNA-ase* (*Promega*) pentru a evita o posibilă contaminare cu ADN. S-a utilizat *RevertAid Reverse Transcriptase* (#EP0441, *Fermentas*) cu primerii Oligo (dT)₁₈ (#SO131, *Fermentas*), Random Hexamer (#SO142, *Fermentas*) și alte componente ale mixului de reacție conform recomandărilor producătorului.

Analiza expresiei genelor prin Real-Time PCR (qPCR) a fost realizată în volum final 20 μ l care conținea 10 μ l *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* (#K0221, *Fermentas*) (conform recomandărilor producătorului) primeri în concentrație de 300 nM, 2 μ l de ADNc diluat de nouă ori. Amplificarea s-a realizat la amplificatorul DT-96, Rusia, conform programului: 95,0 °C – 10 min; 5 cicluri câte 95,0 °C – 10 s, 64,0 °C – 20 s; 40 cicluri: 95,0 °C – 15 s, 60,0 °C – 40 s. Reacția de amplificare a fost urmată de realizarea curbei de topire pentru analiza prezenței primerilor dimerizați.

Confirmarea prezenței ampliconului specific s-a efectuat prin electroforeza în gel de agaroză 2 %, soluția tampon TAE conform protocolului standard. În calitate de marker ADN a servit - MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (#SM0403, *Fermentas*).

Determinarea valorii Ct și a nivelului relativ de expresie a genelor studiate (raportate la gena de referință - α -tubulina) s-a realizat prin programul Real Time_PCR v7.3 (Rusia). Experiența s-a realizat în trei repetiții independente de sinteză a ADNc (pentru fiecare eșantion de ARN) și în repetiție dublă în qPCR (n=6).

Evaluarea nivelului de expresie a genelor prin PCR cantitativ. În acest scop au fost utilizați primeri în baza secvențelor a cinci gene: superoxiddismutaza (*SOD*, GenBank: AK252295), ascorbatperoxidaza (*APX*, GenBank: AJ006358) proteinele asociate patogenezei PR-3 (GenBank: AJ276226), PR-5 (GenBank: AJ276225) și PR-10 (GenBank: AJ220734) (Tabelul 2.3).

Tabelul 2.3. Succesiunea primerilor pentru analiza PCR

Gena	Succesiunea nucleotidică	Lungimea ampliconului, p.b.n.	Numărul de înregistrare a genei în baza de date NCBI
α -tubulina	5'-CTCCATGATGGCCAAGTGTGA-3' 5'-ATGTCGCTTGGTCTTGATGGT-3'	126	Y08490
sod	5'-CCGAAGATGAAATCCGCCAT-3' 5'-CGGCCAATGATTGAATGTGG-3'	126	AK252295
apx	5'-CGGAGCTTTTGAGTGGTGACA-3' 5'-CCGCAGCATATTTCTCCACAA-3'	107	AJ006358
PR3	5'-AGTTGGCCTTGACAAGAAGCG-3' 5'-CGCATAACGTCAAGGACGAAG-3'	104	AJ276226
PR5	5'-ACGACATCTCGGTTATCGACG-3' 5'-TTATTGCCACTGCAGGCGT-3'	153	AJ276225
PR10	5'-CTAGGGTGTTC AAGACGGA-3' 5'-CCCTGAGCTTCGCCACACA-3'	122	AY220734

În calitate de genă de referință a fost utilizată gena α -tubulina (GenBank: Y08490) [489]. Expresia relativă a genelor față de gena de referință a fost calculată după Livak K. și Schmittgen T. [268]:

$$2^{-\Delta C_t}, \text{ unde } \Delta C_t = C_t, \text{ gena} - C_t, \alpha\text{-tubulina} \quad (2.4)$$

2.7. Evaluarea caracterelor cantitative

În descrierea populațiilor, inclusiv celor artificiale, sunt aplicate metode ale geneticii cantitative, ce includ evaluarea varianței genetice și magnitudinea varianței fenotipice a caracterelor [186]. Pentru analiza expresiei și interacțiunii dintre caractere este impusă estimarea individuală a acestora.

Aprecierea valorică a caracterelor cantitative a fost realizată cu ajutorul metodelor biometrice pentru indici după ghidurile UPOV aprobate pentru fiecare cultură [199].

În conformitate cu principiile generale și metodologia testărilor pentru tomate, au fost examinați următorii parametri: înălțimea plantei; numărul de lăstari roditori; numărul de inflorescențe, ciorchine, fructe per ciorchină/plantă; masa unui fruct, numărul de semințe; conținutul de zaharoză, substanțe uscate și aciditatea.

Pentru evaluarea expresiei valorice a parametrilor cantitativi la regeneranții de varză au fost analizați următorii parametri: (lățimea și lungimea frunzei, numărul de frunzulițe, lungimea rădăcinii, tulpinii, conținutul de substanțe uscate.

Caracterele metrice la orz au inclus înălțimea plantei, frați fertili/plantă, lungimea spicului principal, lungimea ultimului internod, boabe/spic, greutatea boabelor/spic, greutatea a 1000 boabe.

2.8. Analiza statistică a datelor experimentale

În calitate de parametri statistici de bază au fost utilizați: media aritmetică și eroarea ($\bar{x} \pm m\bar{x}$), abaterea standard (σ), dispersia sau varianța (σ^2), coeficientul de variație (CV) și corelație (r):

- media aritmetică

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} x_i \quad (2.5)$$

- abaterea standard (σ)

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.6)$$

- dispersia sau varianța (σ^2)

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (2.7)$$

- coeficientul de variație, CV %

$$CV = \sigma / \bar{x} \cdot 100\% \quad (2.8)$$

- coeficientul de corelație

$$r_{xy} = [(S_{xy}/n) - \bar{X}_m \bar{Y}_m] / (\sigma_x \sigma_y) \quad (2.9)$$

Relevanța statistică (P) dintre valorile medii ale parametrilor studiați în diferite loturi s-a calculat folosind criteriul Student:

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / \sqrt{s_1^2 + s_2^2}, \text{ unde} \quad (2.10)$$

$\bar{x}_1$ și $\bar{x}_2$ - valorile medii aritmetice ale variantelor 1 și 2.

Aprecierea diferențelor semnificative s-a realizat prin testul Student. În prelucrarea matematică a datelor au fost utilizate pachetele de programe STATGRAPHICS Plus 2.1, STATGRAPHICS 5, STATISTICA 6. Pentru stabilirea surselor de variație (contribuția genotipului, agentului patogen) și a interacțiunii acestora ca sursă de variație a parametrilor analizați s-a efectuat analiza varianței și contribuția procentuală în baza testului ANOVA.

Concluzii la Capitolul 2

1. Evaluarea citogenetică a interacțiunii dintre virusuri și plantele de cultură a fost examinată în baza a 32 sisteme gazdă-patogen, create ținând cont de particularitățile agentului viral și spectrul speciilor gazdă. În calitate de gazde au servit 8 genotipuri de tomate dintre care 6 stabilite sensibile la VAT, VXC, VMT, 3 de orz de primăvară susceptibile la VMDO și 7 de varză cu sensibilitate la VMCo.

2. Identificarea agenților virali și diagnosticul plantelor bolnave și sănătoase au fost realizate prin tehnici virusologice de studiu (tehnici ale metodei microscopiei electronice prin transmisie: contrastării negative, imunosorbente și metoda ultrasecțiunilor).

3. Pentru inducerea variabilității genetice în sistemele gazdă-patogen analizate au fost utilizate mutageneza experimentală (iradiere cu raze gama) și cultura *in vitro*.

4. Impactul virusurilor patogene asupra plantelor gazdă și generațiilor derivate de la acestea a fost estimat prin metode citogenetice ce au scos în evidență iregularitățile diviziunilor mitotice și meiotice, evenimentelor de recombinare meiotică și mitotică. Aprecierea diversității induse de infecțiile virale la plantele infectate și generațiile acestora a fost apreciată prin metode biochimice de studiu (polimorfismul hordeinelor, peroxidazelor și esterazelor, conținutul substanțelor uscate), moleculare (nivelul de expresie a unor gene asociate patogenezei și potențialului oxidativ) și genetico-ameliorative (expresia caracterelor cantitative).

5. Veridicitatea datelor experimentale a fost realizată prin teste statistice cu ajutorul pachetelor de programe STATGRAPHICS Plus 2.1, STATGRAPHICS 5, STATISTICA 6.

3. EXPERII CITOPATOLOGICE ALE VIROZELOR LA PLANTELE DE CULTURA

Fitovirusurile sunt responsabile nu doar de pierderile cantitative, ci și de cele calitative ale recoltei plantelor de cultură. Infecțiile virale generează un șir de simptome determinate de mai mulți factori, principalii dintre care sunt reacția dintre genotipul gazdei și a virusului, factorii de mediu. 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

Conform unor date mai recente, în diferite regiuni din întreaga Terră, tomatele sunt afectate de cca 146 virusuri [191], dintre care 20 sunt economic importante, majoritatea dintre acestea fiind descrise și pentru Republica Moldova. Impactul negativ provocat de fitovirusuri variază între 10-80%, iar uneori poate atinge până la 100%.

Cele mai răspândite boli provocate de virusurile fitopatogene la tomate sunt: mozaicul, boala frunzelor de feriga, boala petelor de bronz. Mai frecventă și păgubitoare viroză este considerată mozaicul, care poate fi provocată de reprezentanți ai 7 familii (*Tombusviridae*, *Luteoviridae*, *Potyviridae*, *Flexiviridae*, *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, precum și *Virgaviridae*). Cel mai răspândit agent ce provoacă mozaic este considerat virusul mozaicului tutunului.

3.1.1. Identificarea virusurilor fitopatogene la nivel ultrastructural în diferite sisteme gazdă-patogen

La infectarea tomatelor cu VMT 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. 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. Plantele infectate au dezvoltat simptome de mozaic, exprimate prin pete verzui gălbui, care alternau cu porțiuni de culoare verde marmorată, limbul foliar ușor încrețit, de formă neregulată (Figurile A1.1 (C), A1.2 (B)).

Varietățile spontane nu au expus modificări macrostructurale, însă prin aplicarea procedurii de contrastare negativă a fost identificată prezența virionilor virali în frunze și

sepale. Prezența particulelor virale a fost confirmată și la soiurile infectate mecanic, dovedind astfel instalarea la toți taxonii analizați a unui proces patologic productiv.

Prin analiza ultrastructurală în majoritatea celulelor mezofilului au fost detectați virioni distribuiți dispersat prin citoplasmă sau în acumulări imense (Figura 3.1). Particulele VMT au fost identificate și în sepale, celulele peretelui anterelor soiurilor și varietăților analizate, indiferent de gradul de manifestare a simptomelor exterioare. Este important de a menționa, că în celulele sepalelor și anterelor (endoteciul, țesutul tapetal) au fost constatate acumulări semnificative a VMT.

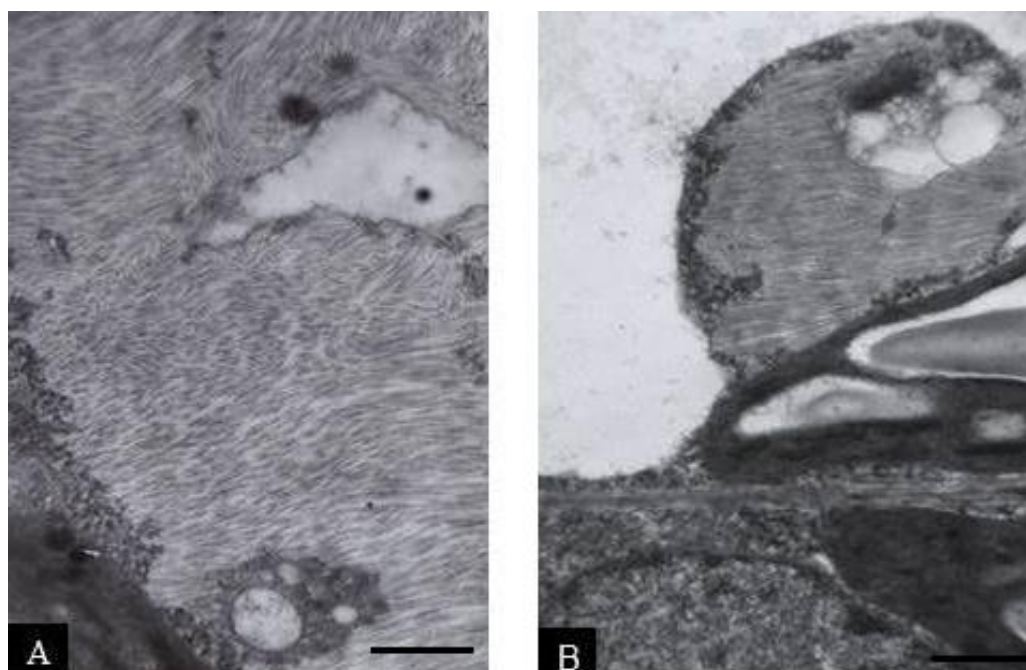


Fig. 3.1. Acumulări intracelulare ale VMT în celulele mezofilului la soiul Elvira (A) și stratului tapetal la *S.pimpinellifolium* (B) (scara barei 0,6 μ m).

Plantele de tomate infectate cu VAT se deosebeau de cele sănătoase prin habitusul compact, aspectul clorotic și colorația antocianică, exemplarele bolnave practic nu au fructificat, iar cele formate au fost mici, cu puține semințe și mezocarpul petrificat (Figurile A1.1(B), A.1.2 (A), (D)). Varietatea spontană *S. pimpinellifolium* L. var. *racemigerum* și specia *S. pimpinellifolium*, de asemenea, nu au prezentat simptome exterioare de boală, cu toate că particulele virusului au fost identificate prin procedeul contrastării negative în țesuturile frunzelor și componentele butonilor floral (sepale, petale, antere) [8].

În celulele mezofiliene ale soiurilor infectate, particulele virale sunt distribuite solitar sau în grup în citoplasmă printre organele celulare sau în agregate cristaloide (Figura 3.2). Distribuție similară a fost descrisă și în celulele sepalelor, țesuturilor anterei plantelor infectate. Conform dimensiunilor și aspectului morfologic, particulele VAT sunt proxime ribozomilor, iar

în cazul dispersării solitare prin citosol, puteau fi distinse prin cromația mai intensă. Astfel, la nivel ultrastructural particulele VAT au fost identificate în toate sistemele gazdă-patogen analizate, iar acumulări mai însemnate au fost remarcate în stratul tapetal și endoteciul. În conglomerări majore VAT a putut fi depistat în stroma plastidelor sau în interiorul vacuolelor. Constatările sunt în concordanță cu datele din literatură, conform cărora plastidele se consideră un sediu al reproducerii genomului viral și al asamblării particulelor acestora [244].

Agregate cristaloide specifice aspermiei au fost vizualizate, în deosebi în celulele tapetale ale soiurilor de tomate.

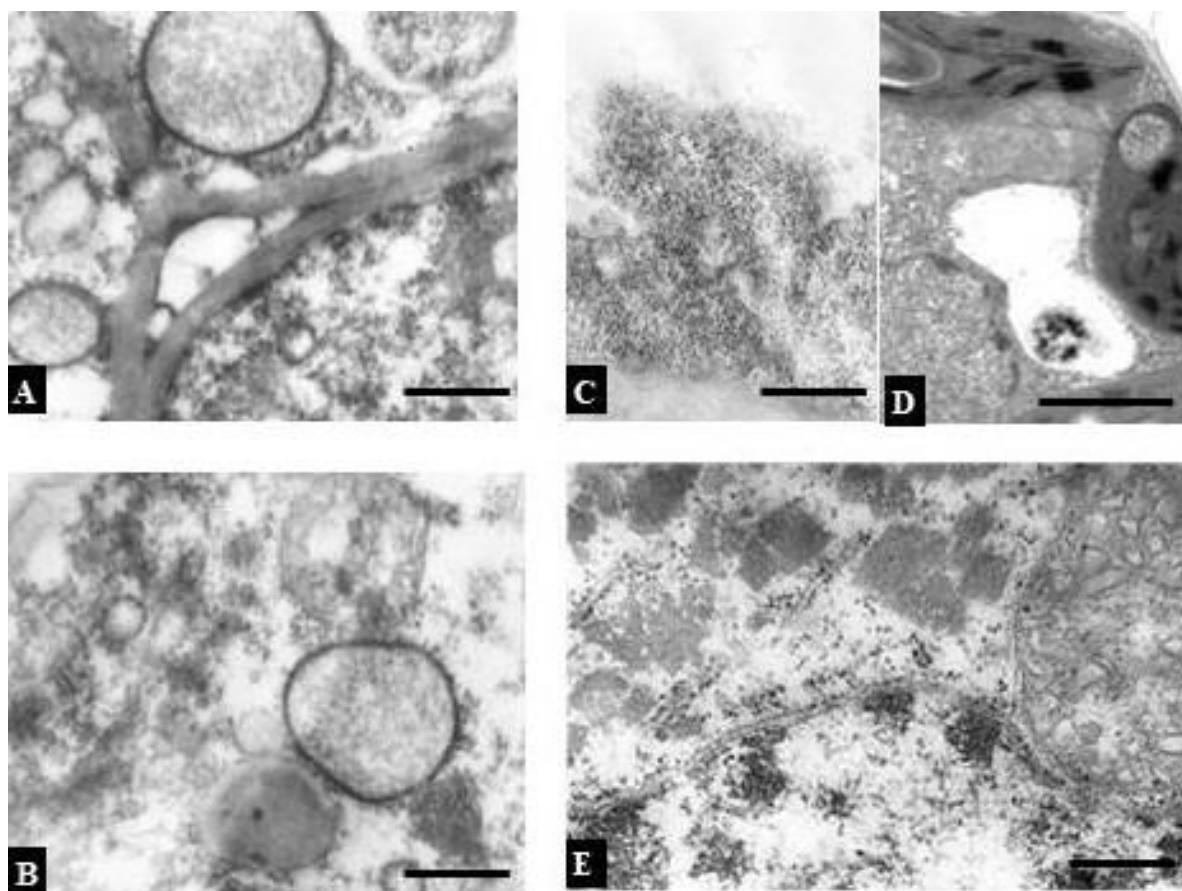


Fig. 3.2. Aspecte ultrastructurale ale celulelor tomatelor infectate cu VAT: structuri veziculare tapetate cu particule virale în citoplasma celulelor mezofilului la s. Fachel (A) și s. Elvira (B), particule dispersate solitar în citoplasma celulelor sepalelor la *S. racemigerum* (C); acumulări intraplastidiene ale VAT în sepale la s. Prizior (D); incluziuni cristaloide citoplasmice în endoteciul la s. Elvira (E) (scara barei 0,4 μ m).

Un impact serios la tomate este cauzat de virusul X al cartofului (VXC). Acest agent patogen este descris în toate regiunile unde se cultivă *Solanum tuberosum*, drept factor ce provoacă pagube majore tomatelor. În cercetările noastre plantele infectate au prezentat o dezvoltare mai încetinită comparativ cu cele sănătoase, limb foliar cu ușoare încrețituri și pete

verzui gălbui în alternanță cu porțiuni de culoare verde marmorată (Figurile A1.1 (C), A 1.2. (C)).

VXC prezintă particule filamentoase cu lungimea de cca 730 nm și diametrul de cca 11 nm (Figura 3.3 B). În celulele infectate cel mai frecvent a fost atestată prezența structurilor concentrice membranare (*Pinwheels*) – incluziuni specifice genului *Potyvirus* (Figurile 3.3 C, D).

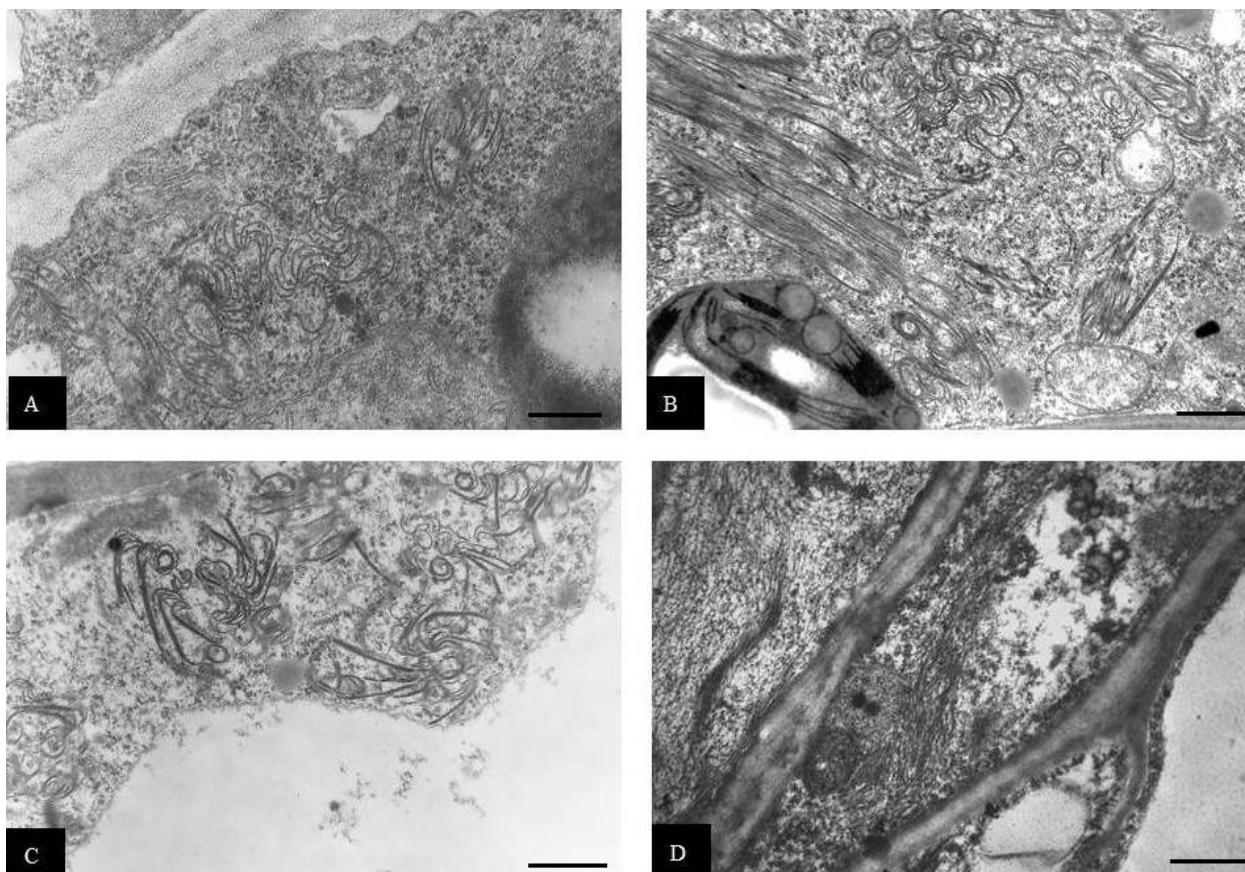


Fig. 3.3. Aspecte ultrastructurale ale celulelor tomatelor infectate cu VXC: structuri membranare în citoplasma celulelor mezofilului s. Fachel (A), *S. pimpinellifolium* (B) și celulele sepalului la s. Elvira (C), particule virale în citoplasma celulelor floemului la *S. racemigerum* (D) (scara barei 0,75 μm).

Se consideră că formațiunile membrane reprezintă suport pentru fixarea complexului reproductiv viral [237]. Este stabilit, că sinteza proteinelor VXC se produce în citoplasmă, cu antrenarea reticulului endoplasmatic, spre deosebire de reprezentanții genurilor *Tymovirus* și *Tombusvirus* pentru care este demonstrată antrenarea lizozomilor, cloroplastelor, peroxizomilor în sinteza componentelor virali [290; 343].

Tobravirusurile, de asemenea, își reproduc genomul lor în citoplasmă și utilizează, de obicei, structuri membranare în ciclurile lor vitale. Mai mult decât atât, proteina PSG a capsidei a fost detectată în cariolimfă în zona nucleolilor. Prin tehnici imunoelectronice această proteină a

fost identificată și în interiorul cloroplastelor cu lamele tilacoidale dezorganizate, cât și în mitocondrii [328].

Dezvoltarea infecțiilor sistemice și propagarea potexvirusurilor prin citoplasmă și, inclusiv, prin plasmodesme dintr-o celulă în alta depinde de proteinele celulare virale și ale gazdei [335]. Potexvirusurile codifică trei proteine de deplasare (TGB1-3). Astfel, proteina TGB1 se deplasează din celulă în celulă prin plasmodesme și necesită TGB2 și TGB3, care sunt proteine localizate în reticulul endoplasmatic (RE). Proteina TGB3 direcționează mișcarea veziculelor derivate din RE induse de proteina TGB2 de la RE perinuclear la ER cortical. Totodată, sunt descrise proteine ale gazdei, care interacționează cu ARN-ul virusului și reglează mișcarea intra- și intercelulară.

3.1.2. Modificări morfostructurale ale celulelor de tomate infectate cu virusuri

Cunoașterea particularităților de reactivitate a organismului în diferite situații patologice, interpretarea interrelațiilor gazdă-virus invocă evaluarea structurii și morfologiei submicroscopice a celulelor, ceea ce permite distingerea modificărilor organelor celulare, detectarea și aprecierea unui spectru mai larg de restructurări.

Conform principiului de interrelații între structură și funcție, aspectul ultrastructural reprezintă o reflectare a decurgerii proceselor metabolice. Elucidarea acestui principiu autorizează cercetări în cele mai variate aspecte, inclusiv testarea acțiunii infecțiilor virale. Studiul electrono-microscopic se lansează cu păstrarea a unui alt principiu – complexitatea structurală cu menținerea particularităților tisulare.

Dezvăluirea aspectului structural-funcțional al celulei este coordonată de elucidarea stării nucleului – centrul vital al celulei, coordonatorul întregii activități celulare (formare, creștere, regenerare, etc.), precum și a organelor celulare.

În celulele mezofiliene ale plantelor infectate cu VMT, nucleeele au prezentat modificări neînsemnate în distribuția și gradul de compactizare a cromatinei (Figurile 3.4 A-C). De regulă, s-au atestat nucleee de formă ovoidală sau rotundă, zone de heterocromatină distribuite de-a lungul membranei nucleare, în special la s. Elvira (Figura 3.4 B). Se cunoaște, că în cromatina perimembranară sunt distribuite secvențele telomerice și centromerice, iar sporirea conglomerărilor de heterocromatină denotă o diminuare a activității nucleului. La soiurile Fachel și Elvira nucleolii prezentau o structură compactă, ce reprezintă, de asemenea, un indice al reprimării proceselor de sinteză a precursorilor ARN ribozomali. La specia *S. pimpinellifolium* se atestau nucleoli de tip nucleolar, precum și o compactizare mai redusă a cromatinei (Figura 3.4 C), ce reflectă o activitate transcripțională mai ridicată [9]. În celulele acestei sisteme citopatice a

fost remarcat și un număr sporit de mitocondrii, cu o distribuție preferențială în jurul nucleului, ceea ce confirmă un nivel funcțional înalt. Un tablou similar a fost atestat și în celulele endoteciului anterelor formate în condiții de patogeneză virală (Figura 3.4 F).

La soiurile Fachel și Elvira infectate cu VMT în celulele endoteciului nucleolele prezentau pe tot perimetrul conglomerări neînsemnate de cromatină, nucleoli mici, compacți, iar în citoplasmă un număr redus de organele celulare (Figura 3.4 D, E).

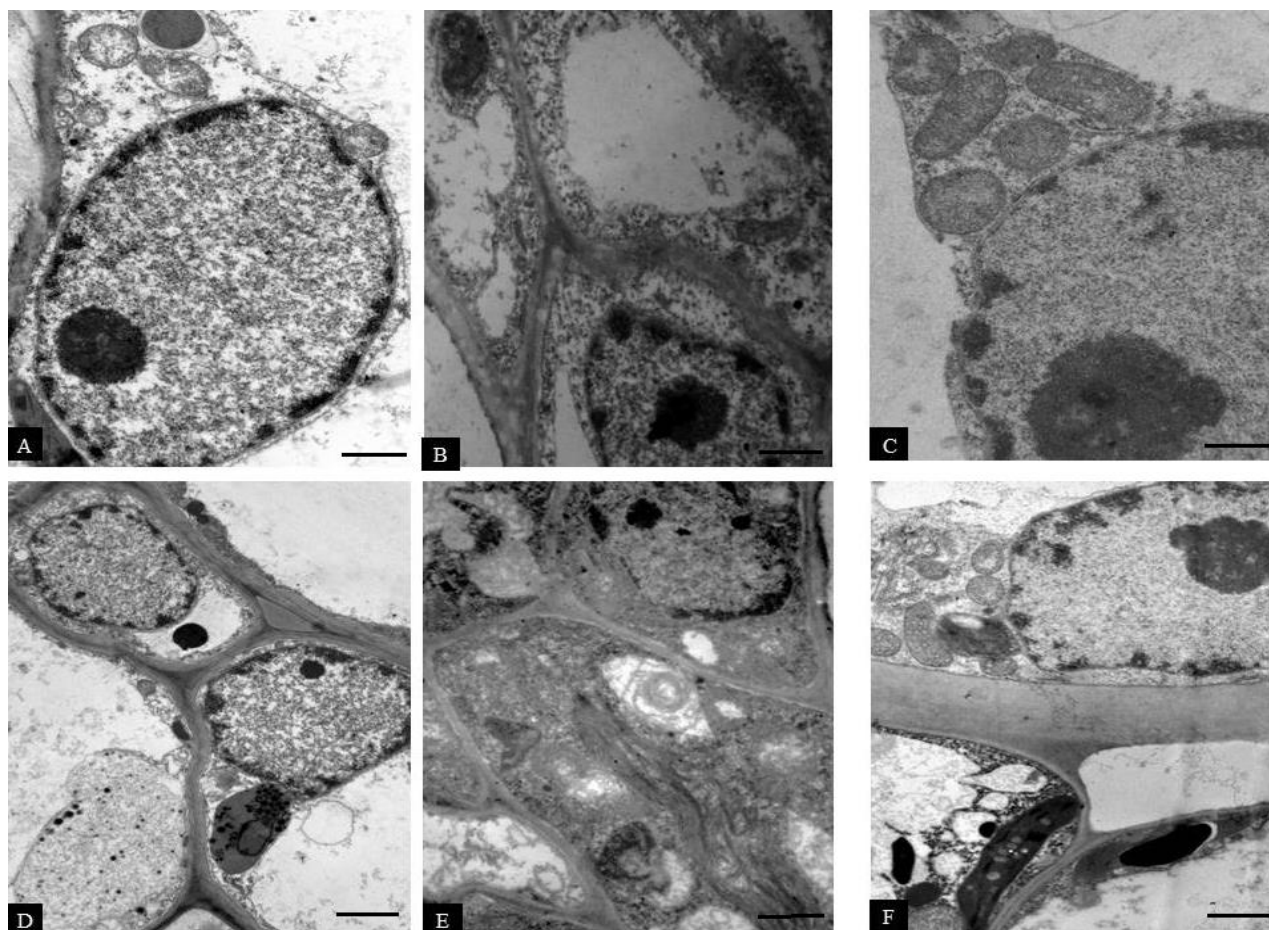


Fig. 3.4. Aspectul ultrastructural în patosistemele create de VMT și genotipurile de tomate: celulele mezofilului la s. Fachel (A), s. Elvira (B), *S. pimpinellifolium* (C) și celulele endoteciului s. Fachel (D), s. Elvira (E), *S. pimpinellifolium* (F) (scara barei 0,8 μ m).

În patosistemele create dintre tomate și VXC sau VAT au fost descrise modificări similare ca trăsătură, fiind remarcate deosebiri între gradul lor de expresie. Infecția cauzată de VXC a generat restructurări asemănătoare VMT, iar VAT a provocat condensări mai accentuate ale cromatinei, în special în celulele endoteciului. Sporirea heterocromatinei este o dovadă a reprimării proceselor de activitate funcțională a nucleelor.

Conform conceptelor clasice ale biologiei celulare, este acceptat, că gradul de condensare al cromatinei indică nivelul activității transcripționale, cunoscând că cromatina condensată nu este accesibilă pentru factorii transcripționali [166].

Toate procesele celulare depind de expresia sau reprimarea diferitelor gene la anumite etape ontogenetice și stări funcționale. În contextul în care fiecare celulă conține același ADN, factorii de transcripție și epigenetici mențin sub control strict expresia genelor. Chiar și o divergență mică în procesul de transcripție corect poate duce la defecte sau inducerea morții programate celulare [216]. S-a ipotetizat, că genele din proximitatea regiunilor condensate ale heterocromatinei influențează expresia lor, astfel cromatina condensată reprezentând compartimente de silențiere. Prin aplicarea fluorescenței GFP cu colorare DAPI a nucleelor celulelor HeLa a fost constatat, că exprimarea histonei H₂B este de 1,4 ori mai mare în heterocromatină față eucromatină. Se consideră, că deosebiri se datorează conținutului sporit a grupelor A-T în heterocromatină ce dețin afinitate sporită pentru DAPI sau colorantul Hoechst. S-a constatat că multe regiuni ale genomului asamblate în heterocromatină sunt transcrise, cum ar fi ADN satelit pericentric, și nu sunt inactive cum se considera o lungă perioadă de timp. Transcrierea heterocromatinei a fost observată la levuri, drosofilă și unele mamifere. Se consideră că aceste stări sunt definite prin mecanisme epigenetice, iar heterocromatina nu este „inaccesibilă pentru transcriere”, dar influențează expresia eucromatinei.

În majoritatea celulelor s-au atestat nucleoli de tip reticular ce dovedește o necesitate extinsă în sinteza precursorilor ribozomali.

Infecțiile virale au generat un șir de modificări și în aspectul morfologic al organitelor celulare (Figura 3.5).

În citoplasma celulelor mezofilului infectate cu VAT, VMT sau VXC au fost atestate mitocondrii cu grad diferit de modificare. La soiul susceptibil Elvira, s-au observat mitocondrii compacte, cu număr redus de criste (Figura 3.5 A). Asemenea organite se întâlneau în citoplasma atât a celulelor mezofilului, cât și în cele ale endotechiului, iar pentru agenții virali studiați (VAT, VXC sau VMT) nu au fost atestate restructurări specifice. La genotipul *S. pimpinellifolium* condriomul se caracterizează printr-un grad mai redus de afectare. Majoritatea mitocondriilor erau de formă rotundă sau ovoidală, cu multiple criste tubulare, prezentând o integritate structurală și funcțională (Figura 3.5 D).

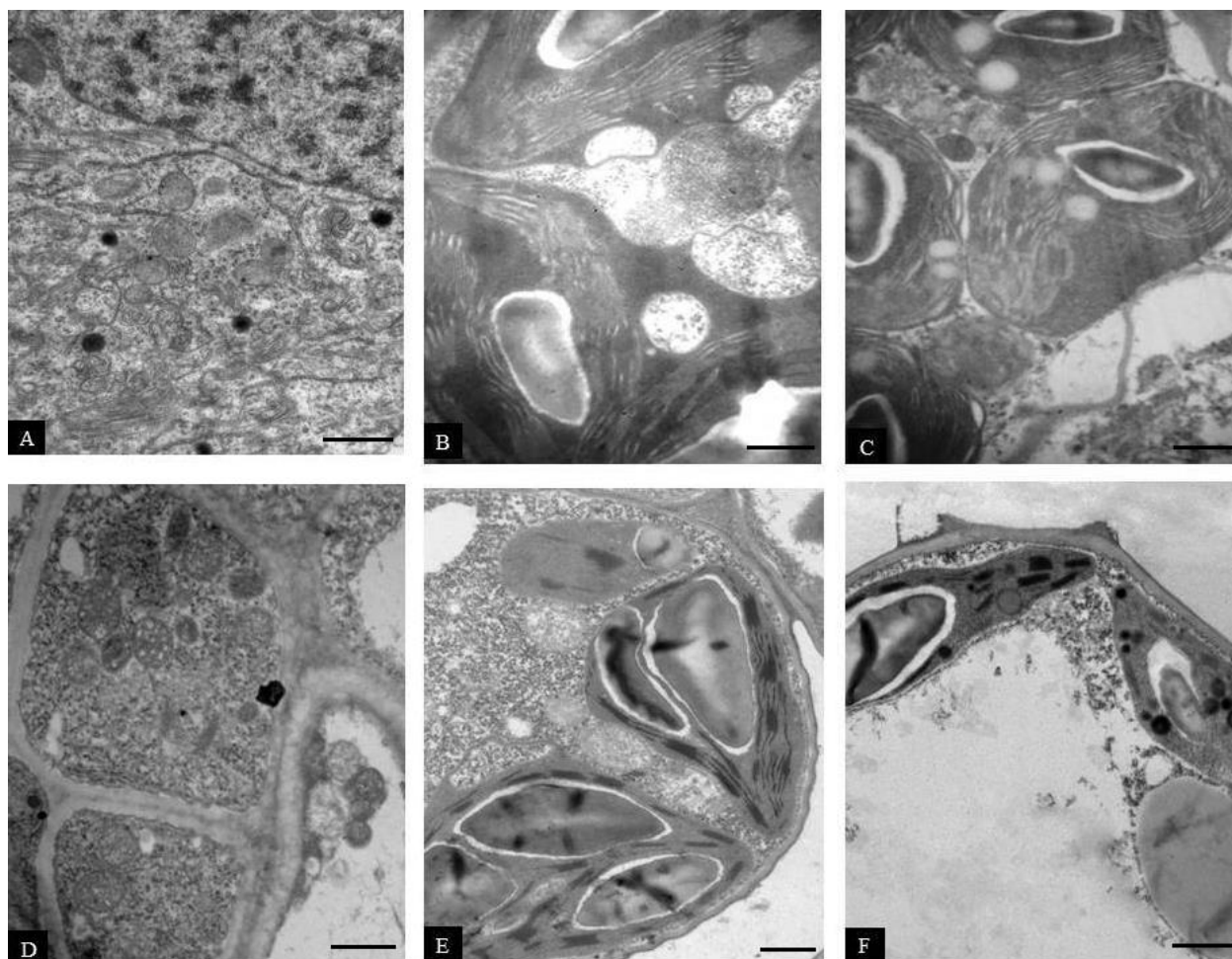


Fig. 3.5. Ultrastructura celulelor mezofilului plantelor infectate cu VAT (A-C) și VXC (D-F) la genotipurile: s. Elvira (A, B, C), *S. racemigerum* (D, E, F) (scara barei 0,85 μm).

În celulele vegetale funcția energetică este asigurată și de plastide, organite cu funcții polivalente. În celulele mezofiliene ale s. Elvira s-a atestat alipirea membranelor tilacoidale, aglutinarea granelor, compactizarea matricei, modificări semnificative ale formei organitelor (Figura 3.5 B, C). Un tablou similar a fost descris și în sistemele citopatice formate cu s. Fachel. În cazul infectării cu VAT, virionii acestui virus erau vizualizați în apropierea sau chiar în matricea plastidelor. Prezența virusurilor în interiorul organitelor este o dovadă a supoziției conform căreia virusurile din genul *Cucumovirus* utilizează membranele tilacoidale în replicarea genomului viral și a matricei plastidiene în asamblarea particulelor virale [275]. În citoplasma celulelor mezofilului la *S. pimpinellifolium* și *S. racemigerum* au fost atestate cloroplaste cu sisteme granale dezvoltate, matrice fin granulară, în stromă deseori erau vizualizate granule de amidon (Figura 3.5 E, F). Este important de remarcat, că și în plastidele formelor spontane puteau fi vizualizate conglomerări ale particulelor virale, totodată fiind păstrată integritatea morfostructurală (Figura 3.5 E).

Organitele sistemului vacuolar (aparatur Golgi, reticulul endoplasmatic, lizozomii, precum și vacuomul) au prezentat grad de reorganizare diferit, 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 erau atestate organite cu diferit grad de expresie al modificărilor structurale: fragmentarea cisternelor reticulului endoplasmatic, pierderea ribozomilor, dar și canalicule morfologic normale cu ribozomi atașați, reducerea numărului ribozomilor liberi. Pe lângă dictiozomii cu structură tipică, a fost remarcată vacuolizarea cisternelor Golgiene, distrucția structurii partite. Este bine cunoscută implicarea ribozomilor cuplați cu RE în sinteza proteinelor rezidente, iar a celor citoplasmatici în formarea compușilor proteici proprii. Tabloul ultrastructural identificat în sistemele citopatice analizate 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 formele spontane (*S. pimpinellifolium* și *S. racemigerum*). Soiurile susceptibile (Fachel, Elvira) au prezentat vulnerabilitate la viroze cu menținerea capacității de asigurare a proceselor productive a infecțiilor virale.

Apreciind spectrul reorganizărilor organitelor celulare poate fi scos în evidență caracterul nespecific al reacțiilor provocate de VAT, VXC sau VMT. Modificări similare sunt atestate atât pentru factori biotici, cât și abiotici [201].

Totodată în celulele afectate de infecțiile virale, au fost remarcate reacții specifice complementare prezenței germenilor și incluziunilor virale, ce includ prezența structurilor mielenice membranare și a structurilor cristaloide (Figura 3.6).

Analiza comparativă a celulelor plantelor de tomate infectate cu diferite virusuri a scos în evidență acumulări ale structurilor de tip mielină (formațiuni concentrice membranare) în cantități mai majore în cazul VAT față de VXC și VMT, totodată acest patogen a indus modificări macro- și microstructurale de o severitate mai complexă.

Conform datelor din literatură, unitățile membranare nu sunt considerate structuri specifice infecției virale în contextul în care sunt atestate și în celulele sănătoase, precum și în condiții de stres cauzate de alți factori [201]. Se consideră că aceste formațiuni provin din membranele reticulare și dețin rol major în detoxifierea celulelor. Este important de menționat,

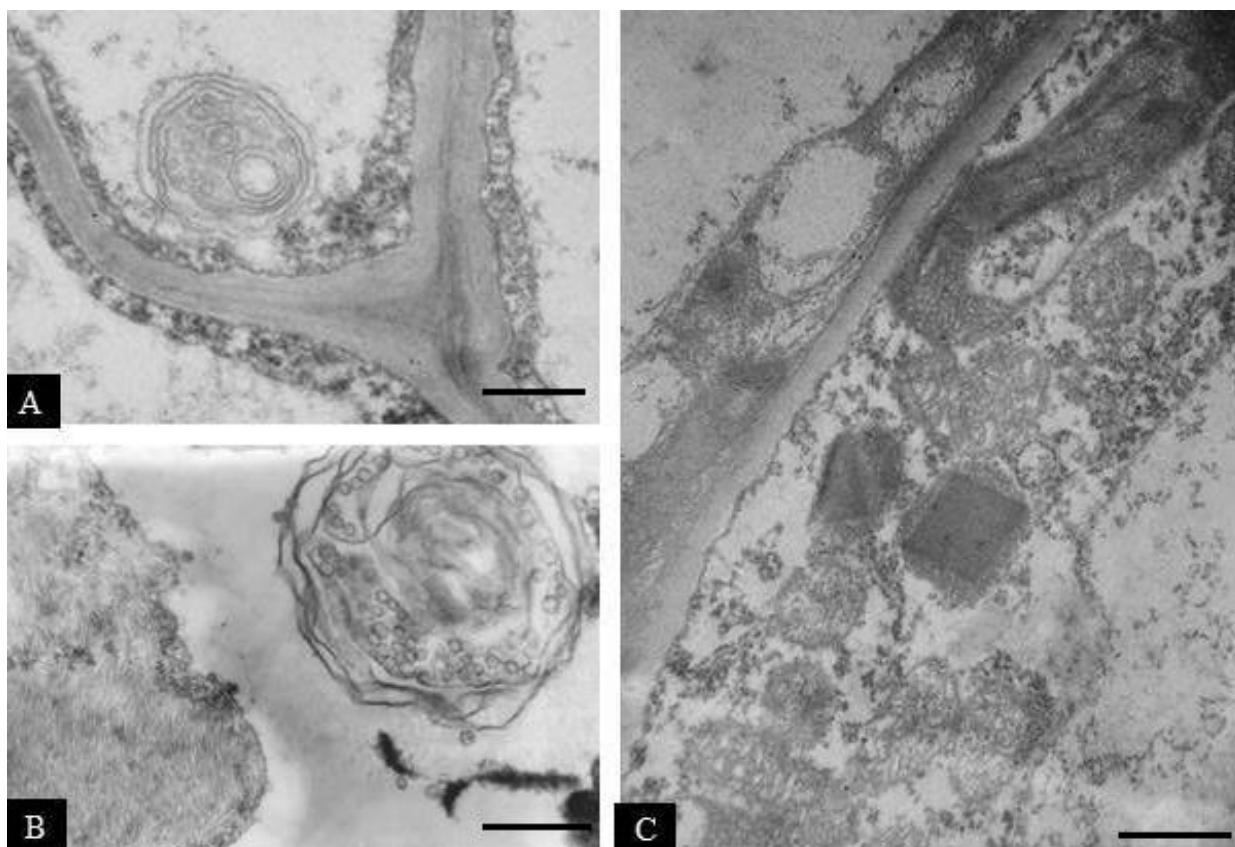


Fig. 3.6. Particularități ultrastructurale ale celulelor genotipurilor de tomate infectate cu virusuri: structuri membranare în celulele mezofilului s. Elvira infectat cu VAT (A) sau VMT (B), fragmente ale celulelor endoteciului formeii spontane *S. racemigerum*, infectate cu VAT (C) (scara barei 0,7 μ m).

că elementele mielinice formate în cazul infecțiilor virale sunt mai abundente și au o structură multipartită [245]. Structurile membranare induse de virusuri sunt motile, însușire necesară pentru a asigura transportul ARN-lui viral de la *site*-urile de sinteză la plasmodesme pentru realizarea transportului de la celulă la celulă. Conform autorilor, asocierea complexelor de replicare a virusurilor cu membranele intracelulare și cu traficul intercelular al particulelor, explica inducerea rapidă și intensă a formării structurilor membranare în cazul infecțiilor virale.

3.1.3. Ultrastructura grăuncioarelor de polen formate în condiții de patogeneză virală

Formarea grăuncioarelor de polen și activitatea gametofitului masculin este o dovadă sigură a stării de funcționalitate și derulare normală ale etapelor ontogenetice.

În sistemele patologice analizate, infecțiile provocate de VAT, VXC și VMT au fost însoțite de acumularea particulelor acestor virusuri în celulele mezofiliene și ale 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 antere cu țesuturi infectate a generat multiple reorganizări în structura internă a acestora (Figura 3.7).

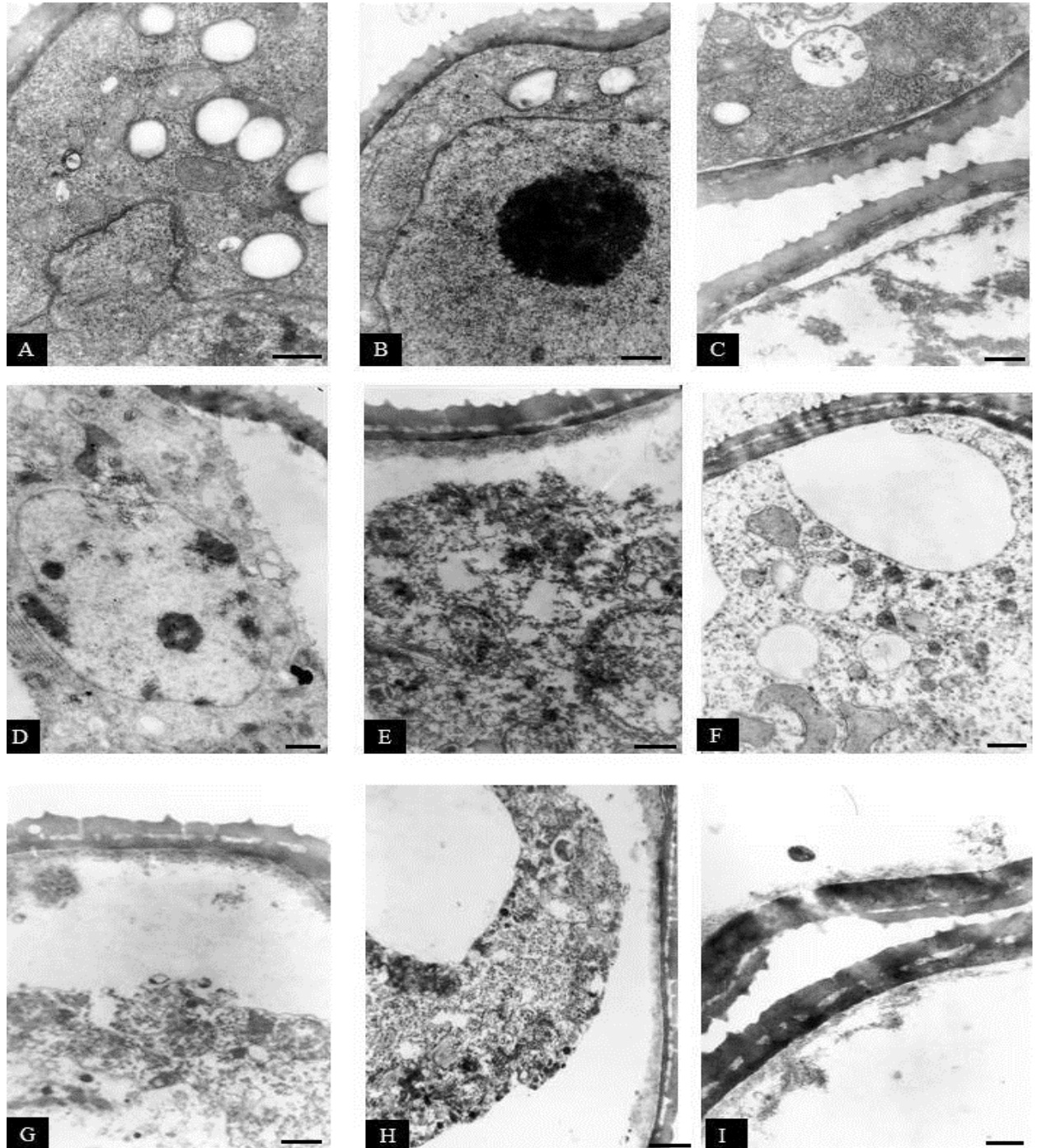


Fig. 3.7. Ultrastructura grăuncioarelor de polen de tomate formate în condiții de patogeneză virală: polen al plantelor sănătoase (A); grăuncioare de polen cu structură normală (B) și modificări de diferit grad în anterele plantelor infectate cu VAT (C, D), VXC (E, G) și VMT (F, H); grăuncioare de polen lipsite de conținut intern (I) (scara barei 1,2 μm).

În studiul utrastructural au fost antrenate anterele aflate în faza de microspori binucleari conform etapei de microsporogeneză [182]. În cadrul aceleiași antere au fost vizualizați microspori cu diferit grad de expresie al reorganizărilor interne. Grăuncioare de polen cu structură tipică ce dețineau celule vegetative și generative au fost remarcate în anterele plantelor sănătoase (Figura 3.7 A), dar și a celor infectate cu virusuri (Figura 3.7 B), însă cu o frecvență mai redusă. Dacă la plantele de tomate sănătoase cota polenului cu structură normală reprezenta majoritatea, în cazul virozelor numărul lor era redus. În special la soiurile susceptibile Fachel și Elvira infectate cu VAT numărul lor era unitar.

În toate variantele experimentale au fost atestate modificări cu caracter similar, dar grad diferit de manifestare: i) grăuncioare de polen lipsite de celula generativă, cu reorganizări ale organitelor celulei vegetative (Figura 3.7 D), ii) grăuncioare de polen cu resturi de conținut citoplasmatic și organite solitare (Figura 3.7 E-H), iii) precum și polen lipsit complet de conținutul intern, dar care păstrau forma tipică (Figura 3.7 A-B).

În primul tip de grăuncioare de polen, celulele vegetative posedau o citoplasmă densă, nuclee mari, eucromatice poziționate preponderent periferic cu nucleoli de tip reticular, dovadă a activității funcționale înalte, fapt confirmat prin numărul major de ribozomi din citoplasmă, prezența ergastoplasmelor. Multiplele mitocondrii și amiloplaste asigurau susținerea necesităților energetice. Celulele generative posedau un nucleu mare, care ocupa practic tot volumul. Conținutul hialoplasmei era redus, însă dens și cu multipli ribozomi. Condriomul era reprezentat prin mitocondrii mici, sferice sau puțin alungite. Asemenea grăuncioare de polen erau vizualizate la tomatele sănătoase, dar și într-un număr redus și în anterele plantelor infectate. La soiurile susceptibile Fachel și Elvira atacate de viroze preleva numeric cel de-al doilea tip de microspori, care se distingeau prin vacuolizarea celulelor vegetative, formarea de multiple punți citoplasmatic. Numărul plastidelor era redus, cu o structură internă degradată și lipsite de amidon. Din organitele sistemului energetic se atestau mitocondrii neregulați cu matrice compactă. Se atesta extinderea cavităților și fragmentarea canalelor reticulului endoplasmatic – distrucții similare celor vizualizate în celulele endoteciei și ale mezofilului. Rar, în special la formele spontane, puteau fi vizualizate ergastoplasme. Nucleele celulelor generative erau puternic eucromatizate, cu invaginări ale membranei și nucleoli compacți. Citoplasma acestor celule se distinge prin aglutinarea constituenților. Deseori membranele plasmatice ale acestor două tipuri de celule lipseau complet sau erau puternic fragmentate. La formele *S. pimpinellifolium* și *S. racemigerum* infectate cu virusuri, aceste două tipuri de grăuncioare de polen se întâlneau practic în același raport. Într-un număr redus se întâlneau și polen lipsit complet

de conținutul intern. Microspori fără constituenții interni se vizualizau frecvent la soiurile Fachel și Elvira infectate, dar și solitar în variantele control.

Astfel, conform studiului ultrastructural, modificările estimate sunt similare după caracter indiferent de genotip și agentul viral. Deosebiri apreciabile vizual au fost identificate doar conform gradul de expresie, având un impact mai distructiv la soiurile susceptibile și mai lejer la formele spontane ce au prezentat toleranță la VAT, VMT. Ținând cont de faptul, că în toate sistemele gazdă-patogen analizate nu se constată propagarea virionilor prin polen, restructurările evidențiate reprezintă un efect indirect al procesului de patogeneză stabilit în aceste genotipuri. Desfășurarea procesului de formare a grăuncioarelor de polen în condițiile virozei productive a fost puternic influențat de modificările întregului status fiziologic al organismului generate de reproducerea componentelor virali.

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 organelor fotosintetic 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 particulelor virale în organele plantei gazdă. Virionii VMDO au fost depistați în celulele mezofilului la toate trei genotipuri cu distribuție preponderentă în vacuole (Figura 3.8 A, B). Particulele virale se întâlneau solitar sau în mici conglomerări, care în majoritatea cazurilor păstrau contactul cu tonoplastul.

Vacuolele ocupau practic întreg volumul celular. În citoplasma dispusă parietal ce conțineau într-un număr major ribozomi liberi, conferind hialoplasmei un aspect cu granulație fină. 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 al traficului intracelular. Interacțiunea dintre genomul viral și cel al plantei gazdă a condus la reorientarea proceselor în favoarea susținerii sintezei componentelor virali. Plastidele sunt preponderent de formă ovală (Figura 3.8 B) cu grad diferit de dezvoltare al sistemului tilacoidal. Numărul saculelor în grane varia de la 1-2 până la 5-6, însă uneori era constatată aglutinarea granelor și reducerea tilacoizilor. În majoritatea cloroplastelor acumulările de amidon, precum și

plastoglobulele lipseau. Condriomul era reprezentat prin mitocondrii sferice, ovoidale cu matrice lucidă și criste tubulare specifice (Figura 3.8 B).

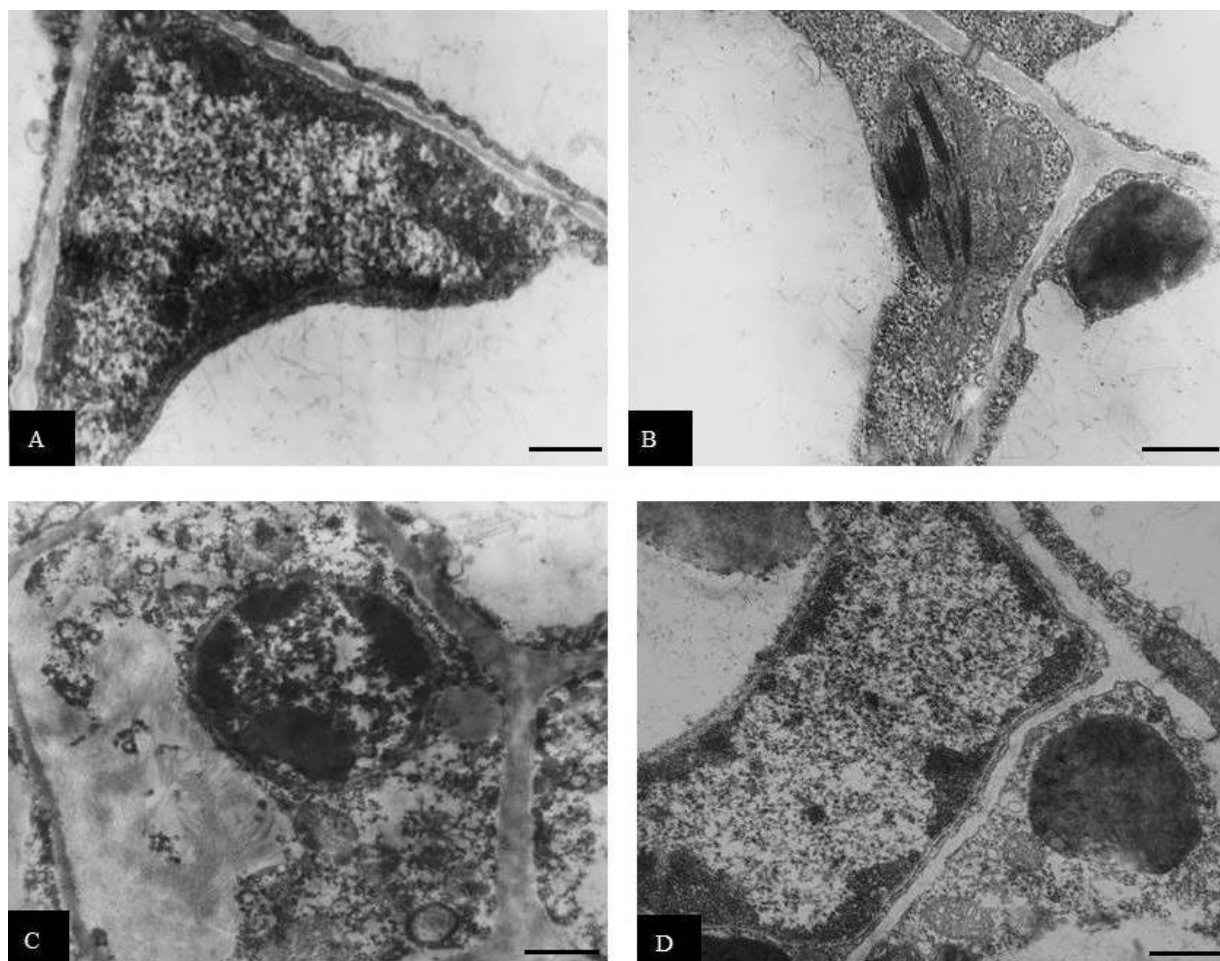


Fig. 3.8. Ultrastructura celulelor mezofilului (A, B) și endoteciului (C, D) ale soiurile de orz infectate cu VMDO: A, C – s. Galactic, B, D – s. Sonor (scara barei 0,7 μ m).

Reprezentativitatea organitelor sistemii energetice indică o solicitare asistată de o asigurare majoră în surse macroergice. O particularitate distinctivă pentru aceste sisteme gazdă-patogen constituie acumularea peroxizomilor. Este bine cunoscută implicarea acestor organite în frunze în ciclul glioxilatului, precum și în procesele de oxidare și detoxifiere.

În celulele țesuturilor de protecție (epidermă) și trofice (endoteciu, stratul tapetal), virionii VMDO aveau o distribuție similară celor ale mezofilului, posedând preferință pentru vacuole ca sediu de stocare (Figura 3.8 C, D). În ce privește gradul de expresie, reorganizările intracelulare au fost mai accentuate în celulele endoteciului. Totodată, în aceste celule, au fost depistate și acumulări mai masive de particule virale în cavitatea vacuolelor, asistate de 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. Trebuie de menționat, că acest soi s-a expus și printr-o expresie mai accentuată a simptomelor exterioare de boală. Nucleolii au fost puternic compactizați, indicând o inhibare a sintezei componentilor 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 preluarea acestei funcții.

Similar celulelor mezofilului, în condițiile patogenezei virale se atestă cumulara 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.

Microsporii formați în condițiile patogenezei virale purtau modificări ale structurii interne. Grăuncioarele de polen formate în anterele plantelor de orz sănătoase prezentau o morfologie bine conturată. Celulele vegetative se disting prin citoplasma bogată în organite: multiple mitocondrii, plastide cu depozitări de amidon, multipli ribozomi liberi, dar și ergastoplasme. Nivelul înalt al activității biosintetice este confirmat și prin aspectul nucleelor, nucleolii frecvent de tip reticular (Figura 3.9 A).

Prin studiul ultrastructural au fost confirmate datele privitor la lipsa germenilor virali în grăuncioarele de polen a soiurilor de orz de primăvară. În literatura de specialitate este expusă mai multă informație privitor la posibilitatea infectării microsporilor și chiar a celulelor spermatice cu VMDO [211]. Totodată, este cert stabilită dependența acestui efect de tulpina virusului și particularitățile genotipului gazdă. Pentru genotipurile analizate de noi (soiurile de primăvară 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 semnificativă 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 (Figura 3.9. B). Ca rezultat al compactizării accentuate a mitocondriilor, acestea se vizualizau ca structuri preferențial sferice sau opace. De asemenea se remarcă reducerea plastidelor și a acumulărilor de amidon. Cu toate acestea, aspectul exterior al grăuncioarelor de polen al plantelor sănătoase și celor infectate a prezentat trăsături similare, păstrând forma rotundă cu brazde la nivelul porilor.

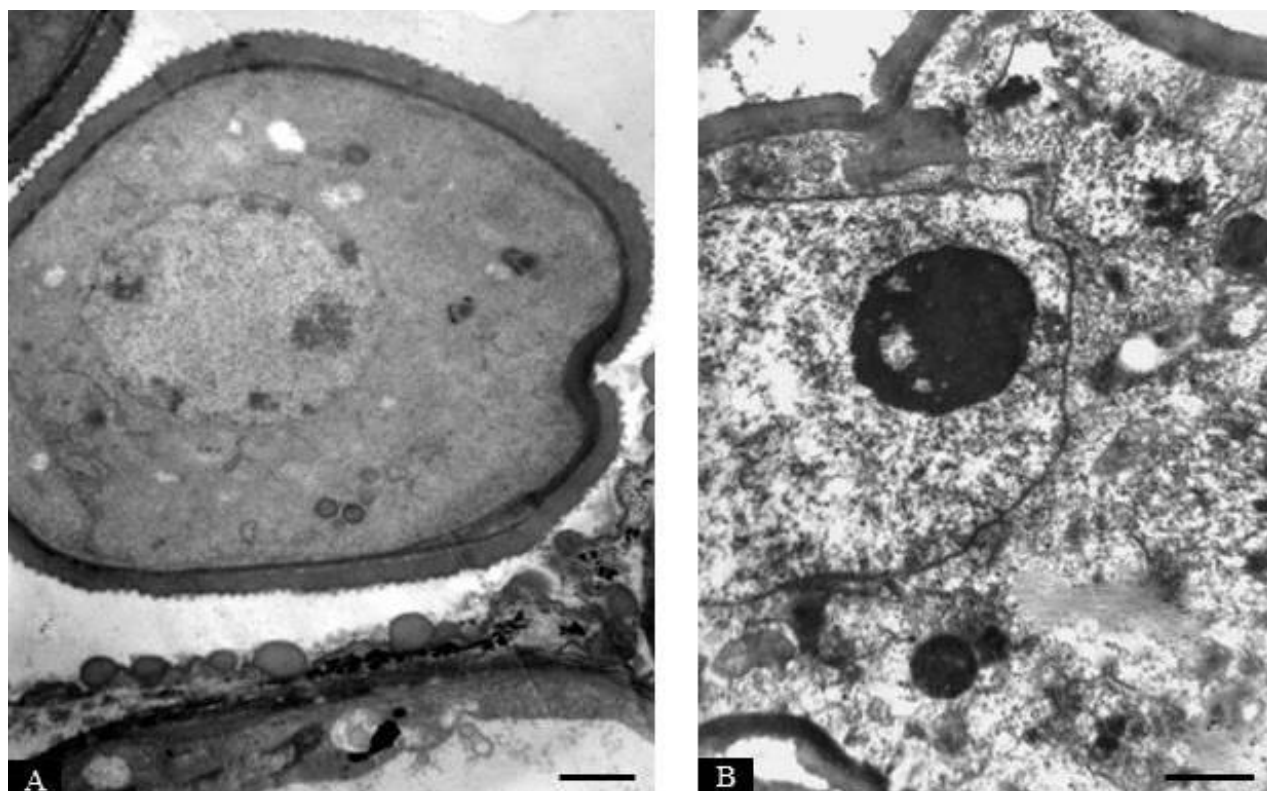


Fig. 3.9. Ultrastructura grăuncioarelor de polen la soiul de orz de primăvară Galactic: A – plante sănătoase, B – infectate cu VMDO (scara barei 0,75 μ m).

Pentru studiul detaliat al aspectului exterior al polenului a fost aplicată metoda microscopiei cu forță atomică (MFA). În acest scop pentru izolarea și prepararea probelor s-a aplicat protocolul propus de [407]. Examinarea obiectelor a fost realizată cu ajutorul sistemului NT-MDT și asistenței acordate de SA „Инструменты нанотехнологии” (or. Moscova, Rusia). În pofida similitudinilor exterioare descrise cu ajutorul microscopiei electronice, cu suportul MFA au fost atestate deosebiri în arhitectura exinei grăuncioarelor plantelor sănătoase comparativ cu cele infectate cu VMDO (Figurile A. 2.1 și A. 2.2).

Din punct de vedere morfologic, peretele grăunciorului de polen este reprezentat prin intină (stratul intern) și exina – extern. Încă de la etapa de tetrade se inițiază formarea stratului pecto-celulozic al intinei și primexinei, care ulterior servește ca matrice a exinei pentru depozitarea sporopoleninei. În intină se conțin de asemenea enzime, diferite tipuri de proteine, inclusiv glicoproteinele AGP, iar formarea acestor compuși este sub controlul gametofitului, în timp ce sinteza sporopoleninei este determinată de cooperarea activității microporilor și celulelor tapetumului. Formarea completă a stratului extern se produce odată cu diferențierea polenului matur și degradarea completă a stratului tapetal. Distribuția sporopoleninei pe suprafața polenului nu este uniformă, iar numărul și dimensiunea aperturilor formate sunt sub control strict al sporofitului [189].

Diferențele stabilite de noi în gradul și abundența expansiunilor exterioare sunt o reflecție a condițiilor patologice ce induc restructurări ale matricei și modificări la nivelul macromoleculelor structurale. Specificul arhitectural generat de reformările compușilor cu rol de semnalare pot cauza perturbări funcționale ce stau la baza interacțiunilor factorilor extraplasmatici și realizarea adeziunii polen/pistil.

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

În baza cercetărilor electronomicroscopice a ultrasecțiunilor țesuturilor mezofilului a fost stabilită prezența virionilor în citoplasmă și în cantități majore – în nucleeele acestora. Particulele virale au fost vizualizate mai frecvent în celulele zonelor cu mozaic sau în vecinătatea lor (Figura 3.10). Distribuția particulelor virale printre materialul genetic al gazdei a indus modificări accentuate ale formei și structurii interne ale nucleelor (Figura 3.10 A, B). În citoplasma celulelor infectate, germenii VMCo apăreau în formă de particule sferice, opace, ce formau deseori conglomerări de diferită formă și mărime. Uneori în celulele contaminate se atestau viroplasmе – structuri virale specifice (Figura 3.10 C).

În celulele plantelor martor nucleeele sunt de formă preponderent sferică sau slab ovoidală. Poziția ocupată este variabilă. Cel mai des, nucleul ocupă centrul geometric al celulei, rareori – spre zonele periferice. Cromatina este distribuită relativ uniform pe perimetrul nucleului, formând o rețea densă cu numeroși nucleomeri, și în zone neînsemnate, atașate de membrana nucleară. În celulele analizate a fost constatat, de regulă, un nucleol distribuit central sau în directă contactare cu cromatina perimembranară și anvelopa nucleară, ceea ce denotă o activitatea intensă a genelor ribozomale asociate organizatorului de nucleol și necesitatea unui schimb nucleo-plasmatic rapid.

În endostructura celulelor plantelor infectate a fost constatată o eterogenitate a întregului statut organelar. Conform tabloului ultrastructural, în aceste celule se remarcă distrucții cu diferit grad de dezvoltare al nucleelor, mitocondriilor, plastidelor, reticulului endoplasmatic. În nucleee se atestă majorarea zonelor de heterocromatină în special spre periferie (Figura 3.10 A). În celulele puternic afectate, reorganizările structurale ale nucleelor au atins un grad major, fiind înregistrată aglutinarea cromatinei, extinderea puternică a spațiului perimembranar (Figura 3.10 B). Asemenea modificări poartă un caracter ireversibil și ulterior duc la moartea celulară.

Structuri specifice formate în celulele infectate cu VMCo reprezintă cristaloizii intranucleari și citoplasmatici. Pfeiffer P. și Hohn T. [340] în urma analizei extractelor de nucleee

și incluziunilor citosolice, au stabilit că sinteza ADN-ului VMCo poate fi parțial inhibată atât de ARNze, cât și de actinomicina D, sugerând prezența unui amestec de molecule de ARN și AND.

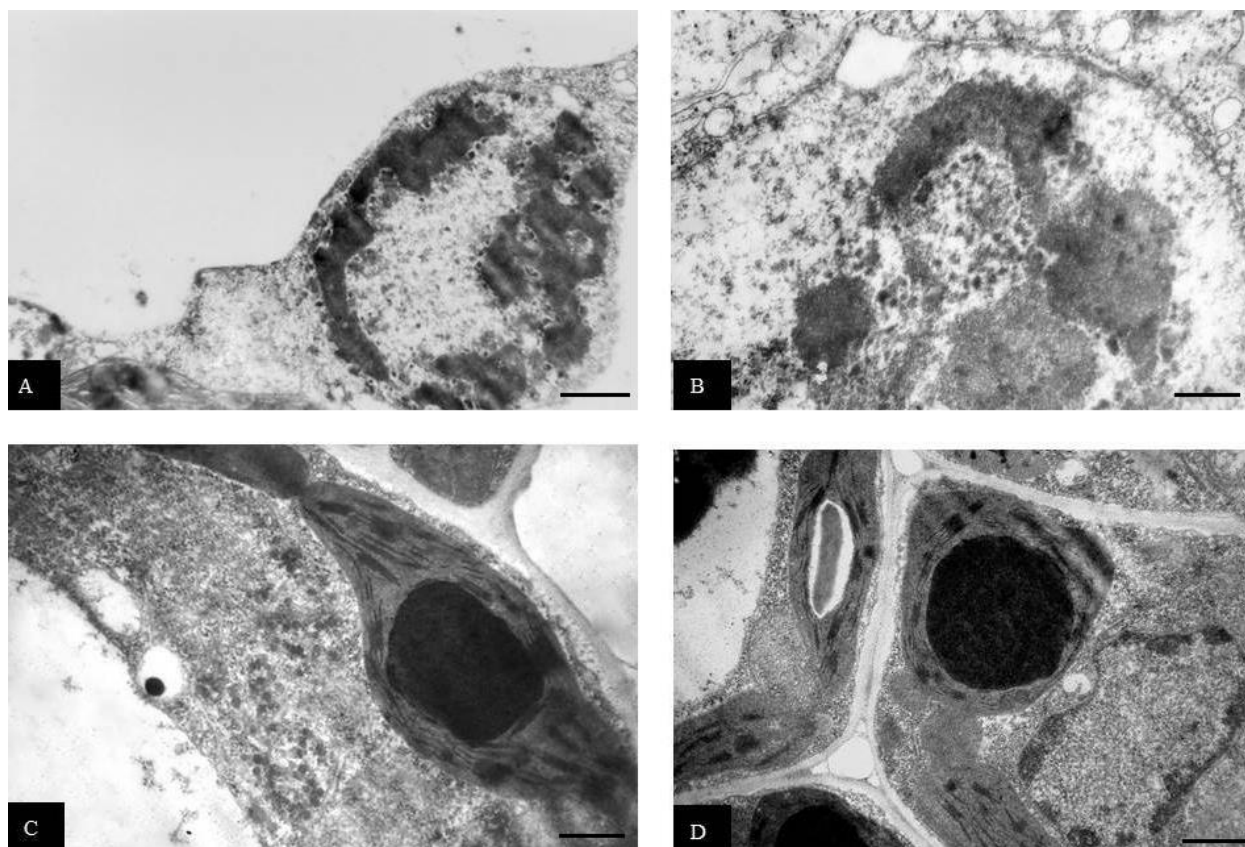


Fig. 3.10. Ultrastructura celulelor mezofilului plantelor infectate cu VMCo: soiul de varză s. Amagher (A, C) și conopidă (B, D) (scara barei 0,6 μm).

Reticulul endoplasmatic granular și neted a fost extins prin toată citoplasma. Canalele reticulului endoplasmatic sunt dispuse neordonat, fiind lărgite, deseori transformându-se în vacuole cu membrana secvențiată. S-a constatat dezintegrarea ribozomilor de pe membranele reticulului endoplasmatic granular și fragmentarea acestuia. Numărul ribozomilor liberi în citoplasmă pare să nu suporte modificări cantitative, însă distribuția lor este modificată. REn este puternic hipertrofiat, apărând sub formă de vezicule mici, strâns alăturate, umplând complet matricea citoplasmatică.

Mitocondriile, de formă preponderent rotundă sau ovală, sunt repartizate uniform în citoplasmă. În cazul infecției virale, se observă distrugerea structurii interne a mitocondriilor. Matricea mitocondrială este hipocromatică. Cristele mitocondriilor sunt fragmentate, iar membrana externă poate fi întreruptă. Alterările severe ale mitocondriilor produc variații ale dimensiunilor și formei, liza completă sau parțială a cristelor, apariția unei matrice clare, luminoase, cu dispariția foitei interne a membranei mitocondriale, pe alocuri și a foitei externe,

creând un tablou specific indus de VMCo. O altă abatere structurală observată în cazul infecției virale este vacuolizarea mitocondriilor. Aceste modificări poartă caracter stereotipic pentru factorii cu impact puternic stresogen și au efect compensatoriu în producerea răspunsului la patogeni, factori abiotici, îmbătrânire [35]. Totodată, virusurile induc sau inhibă diferite procese mitocondriale într-o manieră extrem de specifică cu revizuirea funcției organitei ce rezumă la strategia de utilizare a mitocondriilor în multiplicarea și producerea descendenților virali.

O altă reacție specifică la acțiunea infecției virale complementară modificărilor organitelor celulare, este formarea corpurilor membranare și incluziunilor fenolice, formarea structurilor multiveziculare, rarefierea citoplasmei, apariția punților citoplasmice.

Analiza comparativă morfostructurală a celulelor patosistemelor analizate, precum și a datelor din literatura de specialitate scoate în evidență caracterul stereotipic al modificărilor organitelor intracelulare, care corespund principiilor de organizare ultrastructurală, formulate de Matienko B. și coaut. [477] pentru diferite specii și condiții.

În descrierea tabloului ultrastructural stabilit în celulele infectate cu virusuri cel mai frecvent poate fi menționat *Principiul compensării funcțiilor* (Voronțov), conform căruia reorganizările în cadrul unui sistem sunt compensate de modificările componentelor aceluiasi sistem. Astfel, reticulul endoplasmatic, aparatul Golgi, formând parte din cadrul aceleiași sisteme funcționale (sistemul vacuolar) se compensează între ele. Constatări similare au fost atestate și pentru plastide și mitocondrii (organite ale sistemului energetic).

Antrenarea plastidelor, mitocondriilor și chiar a nucleelor în procesele de replicare și asamblare a componentelor virale poate fi descrisă în baza *Principiilor substituției funcției* Dorn (1875) și *diversificării (extinderii) funcțiilor* Plate (1940). Astfel, funcția de fotosinteză a cloroplastelor este diminuată, iar matricea, setul de enzime, structurile membranare sunt utilizate în sinteza germenilor virali. Diversificarea funcțiilor include sporirea numărului de funcții realizate de organite cu păstrarea celei primare. Acest principiu stă la baza adaptării organismelor la noi condiții. La nivel ultrastructural se manifestă prin formarea de multiple invaginații ale membranei plasmatică și dezvoltarea funcțiilor, uneori litice; depozitarea intratilacoidală a compușilor fenolici.

În categoria celulele puternic afectate de viroze, se înscriu restructurările ce se manifestă după *Principiul decăderii funcțiilor intermediare* (Severtsev), ce includ pierderea unor atribuții cu accentuarea altora complementare. Fragmentarea cisternelor reticulului endoplasmatic rugos și respectiv – decăderea funcțiilor de sinteză și modificare primară a proteinelor, este suplinită prin formarea structurilor membranare. Totodată, virusurile induc sau inhibă diferite procese intracelulare într-un mod extrem de specific cu revizuirea funcțiilor organitelor. O reacție

specifică la virusuri se constată formarea corpurilor de tip mielinic, structurilor multiveziculare, sporirea incluziunilor fenolice, rarefierea citoplasmei și apariția punților citoplasmatiche (Tabelul 3).

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 Orz Varză	Organe vegetative (frunze) 	Țesut al mezofilului	Particule sferice VAT <i>Localizare intracelulară:</i> hialoplasmă; spațiul intramembranar, matricea mitocondriilor și plastidelor.	Formațiuni cristaloide citoplasmatiche
			Particule liniare ale VMT <i>Localizare intracelulară:</i> hialoplasmă, vacuolă.	Structuri membranare
			Particule filamentoase ale VXC <i>Localizare intracelulară:</i> hialoplasmă.	Structuri <i>Pinwheels</i>
Tomate Orz	Organe reproductive (antere) 	Endoteciu	Particule filamentoase ale VMDO <i>Localizare intracelulară:</i> hialoplasmă.	Structuri membranare
		Țesut tapetal	Particule sferice VMCo <i>Localizare intracelulară:</i> hialoplasmă; intranuclear.	Formațiuni cristaloide intranucleare
		Microspori	Nu au fost înregistrate.	Nu au fost înregistrate

Generalizând rezultatele analizei morfostructurale ale celulelor mezofilului și ale endotecului, țesutului tapetal al plantelor infectate cu virusuri putem, scoate în evidență caracterul specific al modificărilor cauzate, gradul cărora este influențat de reacția gazdei la patogen. Reorganizările structurale ale celulelor țesuturilor ce asigură proliferarea virionilor (celulele mezofilului, tapetumului și endotecului), precum și celulelor microsporale, lipsite de germeni virali, dar formate în condiții de patogeneză, au expus la nivelul organitelor celulare modificări cu grad eterogen de reliefare. Grăuncioarele de polen ale plantelor sistemelor virus-gazdă analizate, deși nu constituie sediu pentru replicarea și propagarea virusurilor, au prezentat restructurări intracelulare drept consecință a formării și dezvoltării lor asociativ țesuturilor infectate ale anterelor (endoteciu, stratul tapetal).

Concluzii la Capitolul 3

1. Virozele cauzate de virusurile aspermiei tomatelor, X al cartofului, mozaicului tutunului la plantele de tomate, virusul mozaicului dungat al orzului la orz și virusului mozaicului conopidei la varză sunt complementate de modificări macro- și microstructurale, rezultate în urma interacțiunii dintre patogen – gazda susceptibilă și manifestate prin reacții specifice și nespecifice.
2. Evaluarea ultrastructurii celulelor mezofilului, endoteciului plantelor de tomate infectate cu VAT, VXC, VMT, orz afectate de VMDO și varză inoculate cu VMCo a pus în evidență în citoplasma celulelor infectate prezența particulelor virale, precum și a incluziunilor intracelulare specifice (structurilor membranare concentrice *Pinwheels*, formațiunilor cristaloide), ceea ce reprezintă reacții specifice și servesc drept criteriu de diagnostic virusologic.
3. Studiile ultrastructurale oferă date importante privitor la reorganizările structurale ale celulelor țesuturilor ce asigură proliferarea virionilor (celulelor mezofilului, tapetumului și endoteciului anterelor), precum și celulelor microsporale, lipsite de germeni virali, dar formate în condiții de patogeneză.

La soiurile sensibile de tomate, orz s-a stabilit o acumulare mai sporită a germenilor virali în țesuturile sterile ale anterei comparativ cu celulele mezofilului.
4. Grăuncioarele de polen ale plantelor sistemelor gazdă-patogen analizate, deși nu constituie sediu pentru replicarea și proliferarea virusurilor, au prezentat restructurări intracelulare drept consecință a formării și dezvoltării lor asociativ țesuturilor infectate ale anterelor (endoteciu, stratul tapetal).
5. Modificările citopatice induse la nivelul organelor celulare poartă caracter stereotipic, manifestând eterogenitate a gradului de expresie în cadrul unei celule, precum și a celulelor aceluiasi țesut.

4. MICROSPOROGENEZA LA TOMATE ȘI ORZ ÎN CONDIȚIILE PATOGENEZEI VIRALE

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

Meioza este un proces conservativ din punct de vedere biologic și evoluționist, esențial pentru plantele cu reproducere sexuată [360]. Meioza este un tip specific de diviziune diferențiată ce are la bază două faze de reproducere precedate de o singură repriză de replicare a ADN-lui, urmată apoi de două runde de segregare a cromozomilor (Anafaza I) și a cromatidelor surori (Anafaza II), procese menite să asigure obiective diametral opuse – stabilitatea genomului și inducerea variabilității genetice [246]. Pe lângă multitudinea lucrărilor științifice ce vizează acest proces, mecanismele moleculare și reglarea meiozei sunt puțin elucidate [326].

Formarea de microspori cu set echilibrat de cromozomi și gameți funcționali este rezultatul desfășurării normale a procesului de meioză. Datorită sensibilității sporite a etapei formării organelor reproductive față de diferiți factori de stres, inclusiv viroze, această etapă este considerată cea mai critică în dezvoltarea plantelor [214].

4.1.1. Particularitățile recombinării meiotice la tomatele infectate cu virusuri

Meioza generează diversitate prin două evenimente: recombinarea și segregarea întâmplătoare a cromozomilor [371]. Recombinarea meiotică implică formarea complexului sinaptonemal și realizarea conjugării cromozomilor între secvențele cu regiuni extinse de omologie. Distribuția schimburilor cromatidice este determinată genetic, fiind limitată de organizarea genomului, interferența alelelor, precum și recesivitatea genelor ce controlează acest proces. Majorarea frecvenței recombinării este o prioritate în programele de ameliorare ce vizează crearea de genotipuri cu noi combinații de gene. Procesul de conjugare a cromozomilor omologi se produce în profaza meiotică, fiind asociat evenimentului de formare a sinapselor și de condensare al ADN-ului. Realizarea acestui proces invocă formarea bivalenților, succesul căruia este determinat de recunoașterea secvențelor omoloage.

Modificarea procesului de schimburi de segmente cromatidice în cadrul cromozomilor omologi poate fi apreciată evaluând distribuția chiasmelor în profaza I a meiozei și a numărului de recombinanți în segmente marcate. Din punct de vedere citogenetic, configurația bivalenților la etapele specifice ale meiozei permit evaluarea conjugării cromozomilor. Potrivit unor autori [349; 392; 421] după coraportul dintre diferite tipuri de bivalenți pot fi apreciate modificările în generarea variabilității genetice. Schimbarea distribuirii chiasmelor în diploten - diachineză

servește drept metodă sigură de estimare a impactului factorilor genetici și de mediu asupra nivelului și spectrului de recombinări [239]. De aceea, este foarte important de a stabili schimbările de acest ordin la plantele infectate cu virusuri.

Conform mai multor autori, înțelegerea deplină a evenimentelor desfășurate în meioză poate fi mai ușor explicată prin evaluarea profazei I. În dependență de condensarea cromozomilor omologi și realizarea complexului sinaptic se succed etapele meiozei, caracteristica căroră este prezentată în multiple analize bibliografice [322; 421]. Totodată se constată lacune vaste în interpretarea evenimentelor conjugării meiotice stabilite în condiții de patogeneză virală.

Relevările vizuale ale meiocitelor au scos în evidență succesiunile morfologice în dependență de gradul de compactizare a cromatinei și conjugare al cromozomilor specific fiecărui stadiu (Figura 4.1).

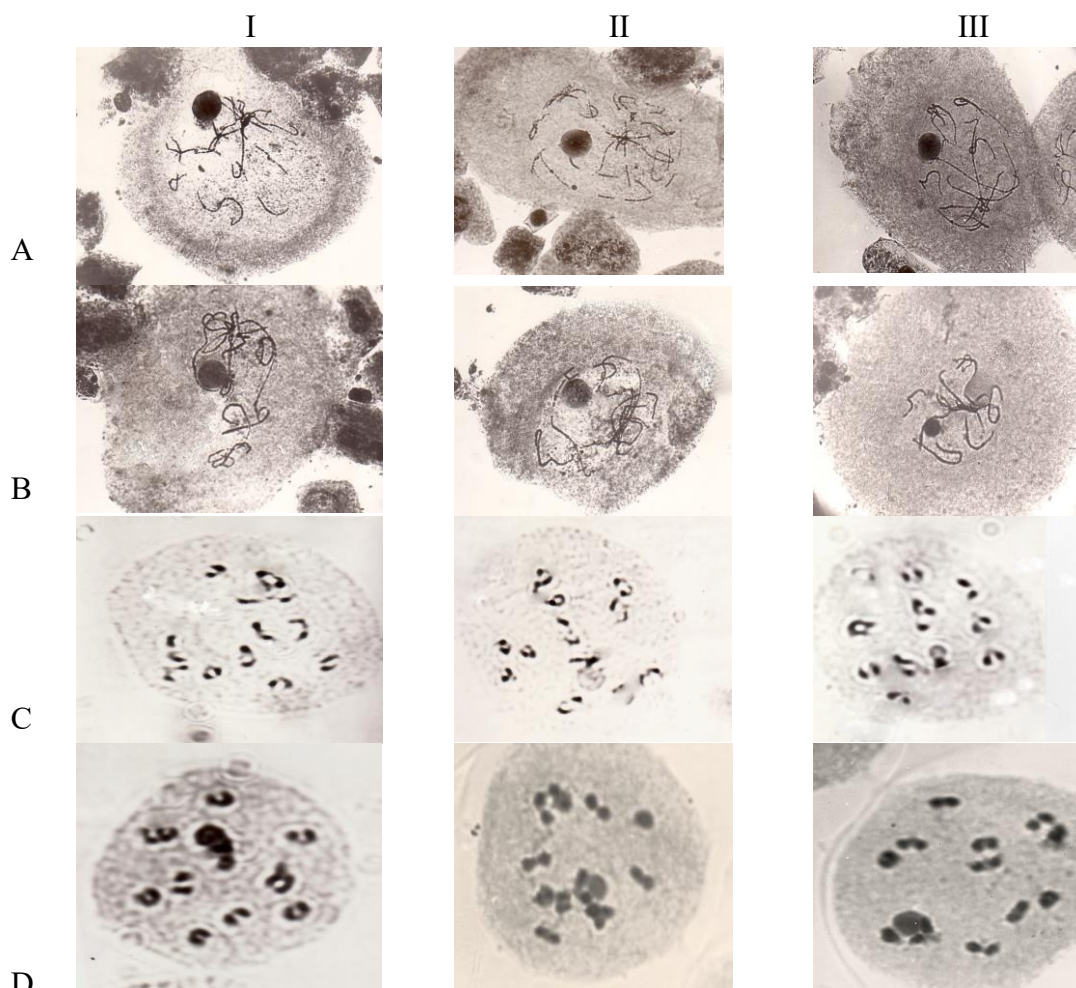


Fig. 4.1. Aspectul meiocitelor de tomate (I - s. Fachel, lotul martor, II – s. Fachel infectat cu VAT și III – varietatea *S.racemigerum*, infectată cu VAT) la diferite etape ale profazei I meiotice: a) zigoten; b) pachiten; c) diachineză timpurie; d) diachineză târzie (x 600).

Pe parcursul etapelor primei profaze se pot urmări schimbările structurale ale nucleolilor, gradului de compactizare a cromozomilor, cu trecerea de la o fază la alta. Pe măsura realizării coeziunilor sinaptice se remarcă scurtarea, îngroșarea cromozomilor și formarea bivalențor. Ca rezultat al asocierii cromozomilor omologi la tomate se formează 12 bivalenți, care pot fi mai ușor examinați în diploten și diachineza timpurie [50].

Din punct de vedere citogenetic, configurația bivalenților permite evaluarea *crossing-over*-ului meiotic. În corespundere cu locul realizării lui se constată formarea chiasmelor, care se consideră a fi expresia citologică a *crossing-over*-ului, iar numărul și distribuția lor reflectă locul și gradul recombinării meiotice.

Evaluarea tipurilor de bivalenți conform locului realizării conjugării (vezi Figura 2.2, capitolul 2) a permis estimarea frecvenței *crossing-over*-ului în regiunile interstițiale și cele telomerice. În experiențele efectuate, conform rezultatelor obținute, soiurile analizate de tomate au reacționat la infectarea cu VAT, VXC, aplicarea razelor gama separate sau în asociere cu infecția virală prin modificarea numărului de chiasme la o celulă mamă polinică (Tabelul 4.1).

Tabelul 4.1. Valoarea medie a numărului de chiasme per CMP la tomatele sănătoase și infectate cu virusuri

Genotipul analizat		Tipul chiasmelor		
		interstițiale	terminale	terminale + interstițiale
s. Fachel	martor	4,035±0,153	12,655±0,273	16,690±0,249
	VAT	6,414±0,182***	13,862±0,297**	20,276±0,371***
	VXC	3,586±0,176*	13,828±0,179***	17,379±0,175**
	radiație	4,207±0,175	12,621±0,287	16,828±0,253
	VAT + radiație	5,862±0,177***	13,276±0,318	19,138±0,389***
	VXC + radiație	3,552±0,169*	13,828±0,179***	17,345±0,174**
s. Nistru	martor	3,690±0,233	13,966±0,246	17,655±0,278
	VAT	5,172±0,165***	12,589±0,331***	17,793±0,379
	VXC	3,724±0,178	14,034±0,219	17,759±0,288
	radiație	3,828±0,211	14,241±0,241	18,069±0,293
	VAT + radiație	5,276±0,163***	12,897±0,303**	18,207±0,315
	VXC + radiație	3,897±0,188	14,276±0,243	18,172±0,306
s. Prizior	martor	3,931±0,297	13,279±0,289	17,172±0,289
	VAT	6,483±0,346***	11,897±0,323***	18,345±0,337**
	VXC	4,759±0,177*	13,655±0,281	18,345±0,229***
	radiație	4,138±0,279	13,862±0,271	17,966±0,287*
	VAT + radiație	6,310±0,302***	12,276±0,313**	18,552±0,339**
	VXC + radiație	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 statistic confirmate au fost înregistrate pentru soiurile Fachel și 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 virusul aspermiei tomatelor. Majorarea numărului de chiasme interstițiale la genotipul menționat a fost însoțită de micșorarea numărului de chiasme terminale, ceea ce și a determinat lipsa suportului statistic pentru variația valorii totale a chiasmelor. O situație similară a fost remarcată și în cazul iradierii plantelor s. Nistru infectate cu VAT. Tendințe similare de majorare a chiasmelor interstițiale urmate de reducerea celor terminale au fost descrise și pentru s. Prizior, în timp ce la s. Fachel factorii analizați au indus majorarea atât a chiasmelor interstițiale, cât și a celor terminale.

Cele mai semnificative diferențe au fost înregistrate la combinațiile gazdă-patogen cu utilizarea VAT. Impactul cauzat de VAT a fost mai mare decât cel generat de către VXC sau razele gama în doza 20 kR.

Aplicarea testului Anova a scos în evidență contribuția majoră a infecției virale în modificarea chiasmelor interstițiale (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Analiza varianței numărului de chiasme interstițiale la plantele de tomate sănătoase și infectate cu virusurile aspermiei tomatelor și X al cartofului

Sursa variației	Contribuția procentuală a sursei de variație, %	Grad de libertate	Suma pătratelor	Varianța	Testul Fisher	P
A: Genotipul	5,14	2	63,487	31,7438	22,70	0,0000
B: Virusul	33,26	2	411,019	205,5090	146,95	0,0000
C: Radiația	0,0001	1	0,139	0,1398	0,10	0,7520
Interacțiunea AB	3,61	4	44,657	11,1643	7,98	0,0000
Interacțiunea AC	0,29	2	2,059	1,0298	0,74	0,4793
Interacțiunea BC	0,47	2	5,851	2,9254	2,09	0,1245
Interacțiunea ABC	0,17	4	1,443	0,3607	0,26	0,9048
Total		517	1235,86			

Conform datelor obținute, variația chiasmelor interstițiale per CMP este determinată de infecția virală în proporție de 33,26%, genotipul deținând o putere de influență în proporție de 5,14%.

În baza analizei clusteriene se atestă interrelații deosebite între diferite tipuri de bivalenți în varianta virus comparativ cu martorul (Figura 4.2).

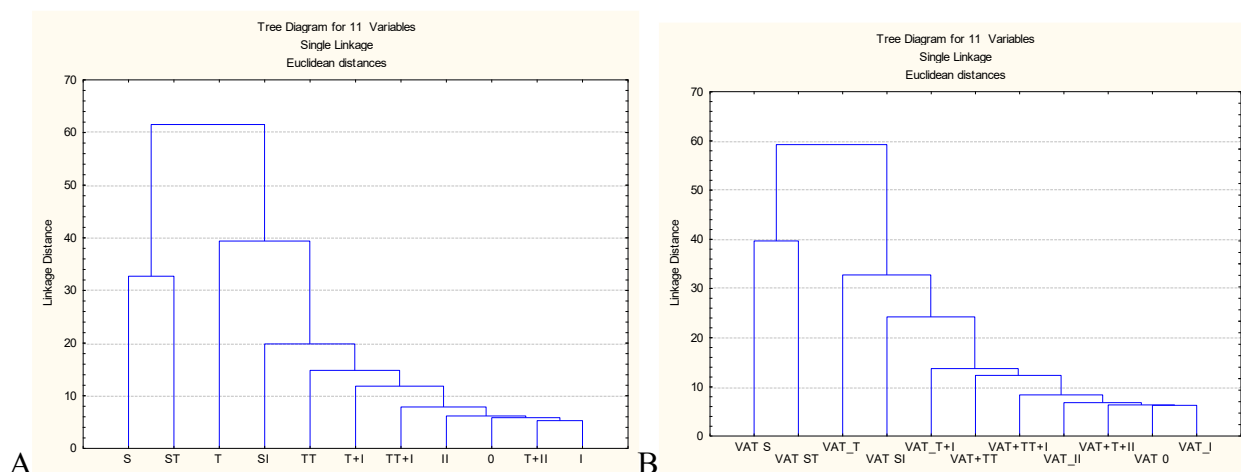


Fig. 4.2. Distribuția tipurilor de bivalenți la genotipurile analizate ale plantelor sănătoase (A) și virus infectate (B).

Conform dendrogramei după metoda celor mai mici distanțe (*Nearest Neighbor Method*) stabilim o frecvență diferită a tipurilor de bivalenți în variantele experimentale comparativ cu cele martor. Este important de remarcat, că redistribuirea tipurilor de bivalenți se atestă la toate genotipurile de tomate analizate în cazul infectării cu virusuri (Figura A 4.1).

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 uniți în regiunea telomerică. Dacă la plantele martor, apariția univalenților este asociată cu tipul de bivalenți cu două chiasme interstițiale, sub acțiunea infecției virale formarea univalenților este influențată primordial de tipurile de bivalenți „T+II” și „I” [93].

4.1.2. Aprecierea recombinării meiotice la descendenții tomatelor infectate cu virusuri

Ca urmare a infectării tomatelor cu TAV în diachineză se schimbă coraportul dintre numărul de chiasme terminale și interstițiale la o CMP. Soiurile analizate manifestă susceptibilitate la infectare cu VAT, iar impactul infecției virale asupra proceselor meiotice au fost similare. În cazul varietății spontane *S. racemigerum*, care a prezentat toleranță la VAT (Tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Frecvența tipurilor de bivalenți per CMP (n=12) la tomatele infectate cu VAT

Tip bivalenți	s. Nistru		<i>S. pimpinellifolium</i> var. <i>racemigerum</i>	
	martor	VAT	martor	VAT
I	0,310±0,087	0,758±0,081***	0,331±0,076	0,414±0,093*
II	0,552±0,094	0,310±0,087***	0,448±0,094	0,412±0,076
T	6,724±0,262	6,138±0,257**	7,207±0,245	7,138±0,215
T+I	0,966±0,189	2,414±0,136***	1,241±0,176	1,310±0,186
T+II	0,103±0,058	0,034±0,034***	0,138±0,065	0,172±0,071*
TT	2,207±0,188	0,724±0,121***	1,621±0,174	1,552±0,169*
TT+I	0,897±0,167	1,276±0,156***	0,586±0,105	0,621±0,115
0	0,241±0,081	0,345±0,089***	0,276±0,084	0,310±0,087
SI	3,517±0,225	5,245±0,134***	3,207±0,207	3,379±0,188*
ST	14,069±0,267	12,365±0,297***	12,828±0,238	12,228±0,231*
S	17,586±0,335	17,599±0,389	15,966±0,287	15,508±0,275

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

Derularea evenimentelor meiotice în condiții de patogeneză a condiționat majorarea frecvenței bivalenților cu o chiasmă interstițială, precum și celor cu una sau două terminale și una interstițială. Aceste modificări au fost asistate de schimbări compensatorii de reducere a cotei bivalenților de tipul „TT” și „T+II”, ceea ce în final conduce doar la modificarea sumei totale a chiasmelor după poziția deținută (interstițială sau terminală), cea totală fiind neschimbată. 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 presupunem, că în urma infectării genotipurilor studiate cu VAT are loc atât redistribuirea, cât și inducerea unor noi schimburi de segmente cromatidice. Efecte similare s-au înregistrat la plantele ce dețin cromozomi supranumerari (B), care provoacă schimbări în conjugarea cromozomilor A, în frecvența și distribuția chiasmelor între cromozomi și de-a lungul lor. Autorii Bell O. și Burt A. [66] afirmă că prezența în plante a ADN-ului exogen provoacă redistribuirea chiasmelor ca urmare a măririi numărului de chiasme interstițiale concomitent cu micșorarea celor terminale. Asemenea redistribuire are o mare semnificație, deoarece conduce la mărirea recombinării genelor localizate în aceleași 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 [82].

Descendenții plantelor infectate nu au deținut patogeni virali, iar microsporogeneza s-a realizat în plante stabilite sănătoase. Cu toate acestea, recombinația meiotică a deținut valori distinse de la martor cu confirmare statistică pentru genotipurile atât cu reacție de susceptibilitate, cât și cu toleranță (Tabelul 4.4).

Tabelul 4.4. Frecvența tipurilor de bivalenți per CMP la descendenții sănătoși ai tomatelor infectate cu VAT

Tip bivalenți	s. Nistru		<i>S. pimpinellifolium</i> var. <i>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.

Frecvența recombinației meiotice la descendenții plantelor infectate este mai sporită, față de martor. Creșterea valorii *crosing-over*-ului s-a produs pe contul inducerii unui număr mai mare de schimburi recombinogene în regiunea interstițială, ceea ce citologic se exprimă prin sporirea cotei bivalenților de tipul „I” și „TT+I” [43].

Amplitudinea redusă a fluctuațiilor valorilor medii ale chiasmelor este determinată de modificările stabilite în coraportul diferitelor tipuri de bivalenți. Atât în variantele martor, cât și în cele experimentale mai frecvenți au fost bivalenții ce dețin una sau două chiasme în regiunea telomerică. Infecția virală a indus modificări în generația liberă de virusuri ce au generat sporirea chiasmelor interstițiale. Este important de menționat, că atât la plantele infectate, cât la descendenții acestora se remarcă creșterea numărului de univalenți.

Analiza fluctuațiilor diferitelor tipuri de bivalenți per CMP a relevat diferențe între variantele experimentale analizate (Figura 4.3).

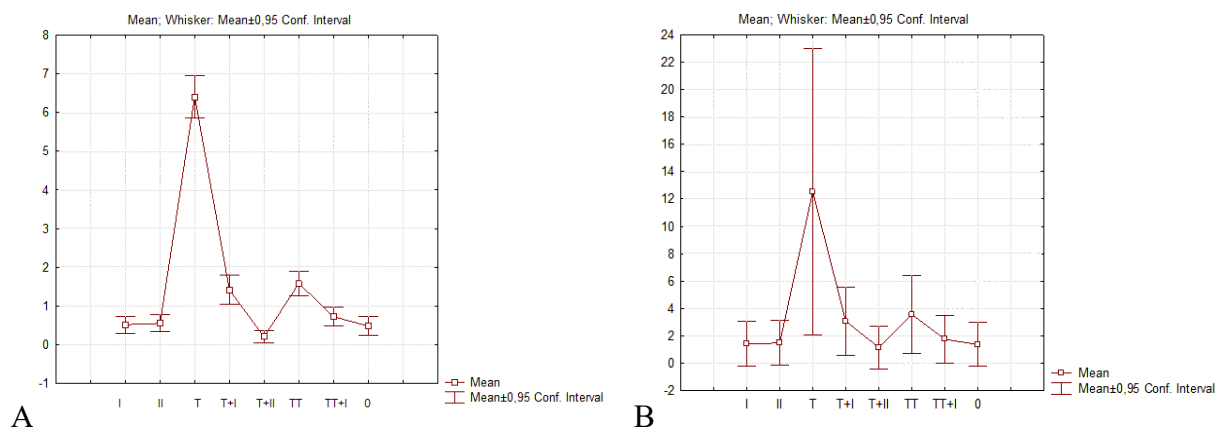


Fig. 4.3. Distribuția tipurilor de bivalenți la descendenții plantelor martor (A) și infectate cu VAT (B).

Rata totală a chiasmelor la plantele martor și variantele experimentale este determinată de către chiasmele terminale și primordial de cele de tipul „T”. Se poate admite ca aceste modificări sunt influențate de procesul de terminalizare a chiasmelor. De regulă, terminalizarea se soldează cu concentrarea chiasmelor la capetele bivalenților și reducerea numărului total de chiasme per bivalent. Conform mai multor autori ce susțin conceptul terminalizării chiasmelor, creșterea frecvenței chiasmelor terminale se produce pe contul reducerii celor interstițiale. În cercetările noastre nu au fost constatate asemenea remanieri în distribuirea coeziunilor cromatidice și, corespunzător, modificările nivelului *crosing-over*-lui meiotic nu pot fi explicate în baza conceptului terminalizării. Astfel, schimbările numărului de chiasme per bivalent au fost asigurate de redistribuirea și inducerea de noi schimburi cromatidice în cadrul cromozomilor omologi. Cu aplicarea tehnicilor moderne la mai multe specii, inclusiv tomate, a fost demonstrat, că asociațiile terminale ale cromozomilor nu sunt rezultatul terminalizării chiasmelor. Conform autorilor, coeziunile terminale vizualizate la finalul diachinezei sunt achiasmatică și sunt formate prin asocierea capetelor telomerice [36; 37; 84].

Totodată, la descendenții s. Nistru și *S. racemigerum* obținuți de la plante infectate a fost descrisă o creștere semnificativă a frecvenței univalenților – cu 19,7% și 17,1%. Cauza apariției univalenților se consideră a fi asinapsia sau desinapsia. În cazul asinapsiei nu se constată realizarea conjugării între segmentele omoloage. La mutațiile desinaptice coeziunea primară se realizează, însă ulterior în diachineză cromozomii se separă, rămânând alăturați.

Cu aplicarea metodelor moleculare de studiu drept cauză a formării univalenților în metafaza I este dovedită inactivarea genei *Spo11*, implicată în producerea rupturilor dublu catenare ale ADN-ului [109]. De asemenea, inducerea univalenților în anafaza I poate fi rezultatul dereglării coeziunilor ca urmare a supresiei genei *Rec8*.

4.2. Evaluarea procesului de meioză la orzul de primăvară în condiții de patogeneză virală

4.2.1. Particularitățile recombinării meiotice la plantele de orz infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului

Studiul citologic al microsporocitelor de orz a relevat succesiunea morfologică specifică etapelor meiotice în funcție de gradul de compactizare a cromatinei și de conjugarea specifică a cromozomilor. În profaza primei diviziuni, la etapele de leptoten, se disting firele subțiri de cromatină care înconjoară sau acoperă nucleolul (Figura 4.4 A-D). Ulterior se atestă îngroșarea cromozomilor împerecheați formând fire groase (Figura 4.4 E-H). În diploten (Figura 4.4 I-L) se vizualizează bivalenții de diferită formă și mărime, în dependență de perechea de cromozomi conjugați și locul realizării *crossing-over*-ului. În diachineza se remarcă figurile tipice ale bivalenților (Figura 4.4 M-P). Conform examenului citologic, la etapele inițiale ale profazei I meiotice nu au fost evidențiate diferențe vizual apreciable între variantele experimentale [45].

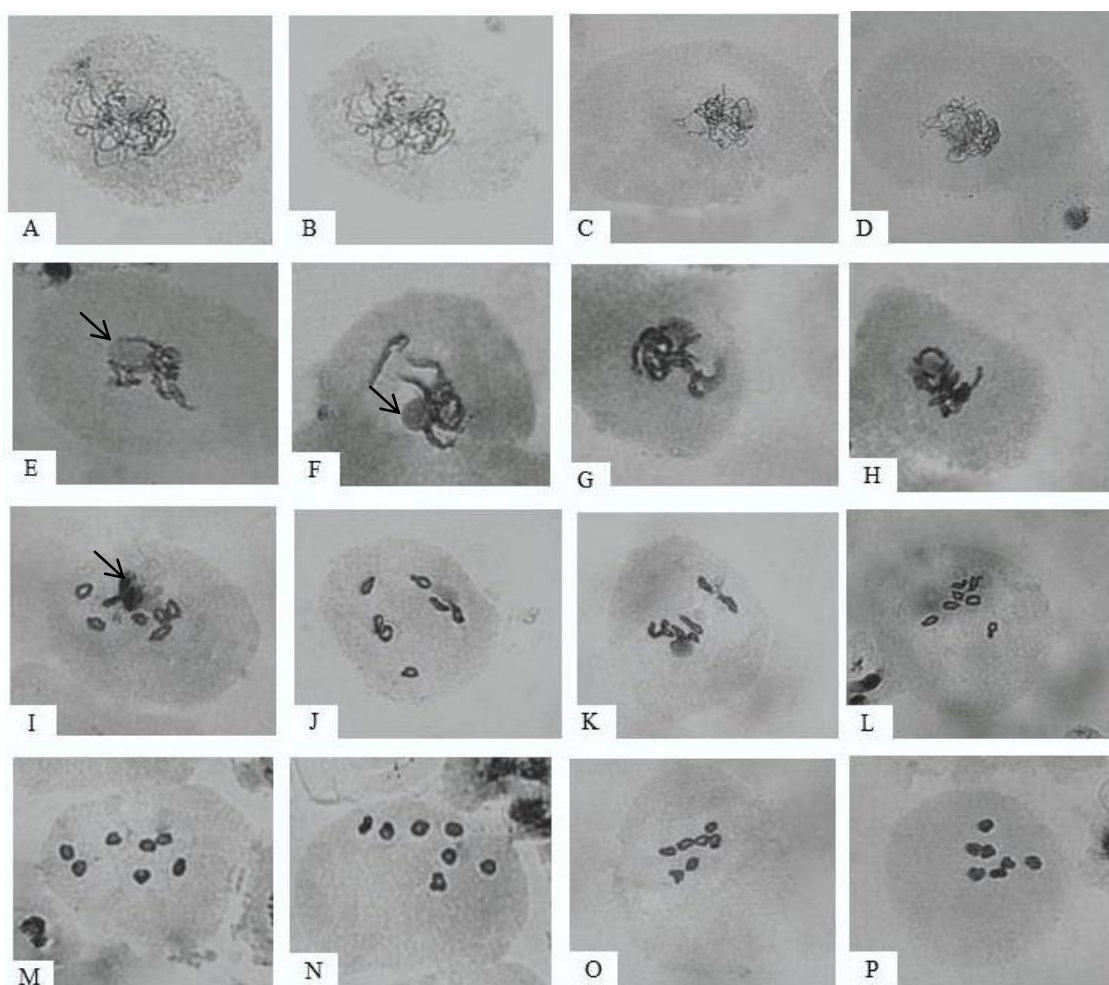


Fig. 4.4. Aspecte citologice ale meiocitelor de orz la diferite etape ale profazei I meiotice: leptoten la plantele sănătoase (A – D), zigoten/pachiten (E – H), diploten (I – L) și diachineza târzie (M – P) la plantele sănătoase ale soiurilor Galactic (A, E, I, M), Sonor (B, F, J), Unirea (N) și infectate cu VMDO, soiurile Galactic (C, P), Sonor (G, O), Unirea (L, P, D, H) (x 600).

Din figurile prezentate se pot constata modificările structurale ale nucleolilor (săgeată), sporirea gradului de compactizare a cromatinei de la o etapă la alta a diviziunii meiotice. În diploten/diachinează ca realizare a coeziunilor sinaptice se distinge scurtarea, îngroșarea și formarea cromozomilor bivalenți. În rezultatul asocierii cromozomilor omologi în celulele mamă polinice normale, se vizualizează 7 bivalenți, care pot fi mai ușor examinați după poziția și numărul chiasmelor. Astfel, configurația bivalenților a fost aplicată în evaluarea frecvenței *crossing-over*-ului meiotic la orz în condițiile patogenezei virale.

Diferențe dintre variantele experimentale au putut fi observate după frecvența diferitelor tipuri de bivalenți, care au permis aprecierea gradului de conjugare meiotică în dependență de poziția și numărul de chiasme (vezi Figura 2.3, capitolul 2).

În investigațiile citologice chiasmele sunt considerate expresia citologică a *crossing-over*-ului, reflectând punctul de coeziune între regiunile de omologie ale cromatidelor nesurori. În conformitate cu poziția chiasmelor de-a lungul brațelor cromozomale a fost apreciată frecvența diferitelor tipuri de bivalenți (Tabelul 4.5).

Tabelul 4.5. Frecvența tipurilor de bivalenți per CMP (2n=14) la soiurile de orz sănătoase și infectate cu VMDO

Tip bivalenți	s. Galactic		s. Sonor		s. Unirea	
	Martor	VMDO	Martor	VMDO	Martor	VMDO
I	0,207±0,077	0,208±0,076	0,172±0,071	0,241±0,081	0,276±0,084	0,241±0,081
II	0,448±0,094	0,138±0,065 **	0,483±0,094	0,172±0,071 **	0,448±0,094	0,241±0,080 *
T	1,345±0,143	1,103±0,143	1,310±0,014	1,069±0,139	1,552±0,127	1,001±0,149
T+I	2,207±0,135	2,310±0,158 *	2,241±0,146	2,379±0,168	2,310±0,132	2,448±0,137
T+II	0,828±0,122	1,517±0,118 ***	0,172±0,071	1,517±0,118 ***	0,758±0,128	1,552±0,106 ***
T+III	0,103±0,058	0,448±0,117 ***	0,103±0,047	0,379±0,092 **	0,138±0,065	0,242±0,088 *
TT	0,827±0,132	0,414±0,105 ***	0,827±0,132	0,414±0,105 *	0,689±0,123	0,414±0,105 *
TT+I	0,931±0,148	0,655±0,103	0,931±0,148	0,689±0,112	0,724±0,139	0,586±0,106
0	0,103±0,084	0,207±0,077 *	0,069±0,048	0,172±0,071 **	0,103±0,056	0,207±0,077 *
SI	6,172±0,269	7,759±0,287 ***	6,276±0,257	7,828±0,254 ***	6,103±0,239	7,345±0,206 ***
ST	7,931±0,302	7,655±0,212 **	7,966±0,308	7,689±0,233 **	7,448±0,219	7,379±0,201 *
S	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.

Atât în varianta martor, cât și în cazul infectării plantelor de orz cu VMDO, în meiocite mai frecvent erau vizualizați bivalenți asociați la un capăt telomeric, precum și conjugați prin două chiasme – una telomerică și una interstițială. Infecția virală a condiționat modificări statistice apreciable la cele trei soiuri analizate. 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. Modificările atestate în distribuția chiasmelor denotă elocvent nu doar redistribuirea coeziunilor dintre cromatidele surori, dar și inducerea de schimburi suplimentare.

La plantele martor numărul mediu al chiasmelor interstițiale a constituit 6,1 la s. Unirea și 6,28 la s. Sonor, iar a celor terminale 7,45 – 7,97 corespunzător. În aspect general, bivalenții erau asociați prin două coeziuni, numărul total al chiasmelor constituind 14,1 și 14,2 la s. Galactic și Sonor respectiv. La plantele neinfectate a s. Unirea cu frecvență mai majoră au fost remarcați univalenții, ceea ce a determinat o medie mai redusă a chiasmelor per bivalent.

Aplicarea testului Anova a scos în evidență dependența prioritară a sumei totale a chiasmelor de locul distribuției coeziunilor (Tabelul 4.6).

Tabelul 4.6. Analiza varianței numărului de chiasme la plantele de orz sănătoase și infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului

Sursă variație	Grad de libertate	Suma pătratelor	Varianța	Testul Fisher	P
A: Tipul de chiasme	8	14819,87	6066,23	4419,06	0,0000
B: Genotipul	2	17,62	8,813	6,42	0,0017
C: Virusul	1	1773,33	773,333	563,30	0,0000
Interacțiunea AB	6	9,917	1,653	1,20	0,3021
Interacțiunea AC	3	92,38	30,793	22,43	0,0000
Interacțiunea BC	2	0,12	0,062	0,05	0,956
Interacțiunea ABC	6	1,44	0,239	0,17	0,9836
Rezidual	672	922,47	1,373		
Total	672	19320,0			

Conform datelor obținute, suma totală a chiasmelor este determinată în proporție de 77% de tipul bivalenților. Puterea de influență a infecției virale constituie peste 9% ($P \leq 0,001$), iar impactul agentului viral nu este dependent de genotip. Genotipul în mod particular, precum și interacțiunea cu ceilalți factori analizați, nu reprezintă o sursă de variație a numărului total de chiasme.

4.2.2. Aprecierea recombinării meiotice la descendenții soiurilor de orz infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului

La plantele martor, valoarea medie a numărului total de chiasme a variat între 13,37 și 13,69 la soiurile Unirea și Sonor respectiv (Tabelul 4.7). Sub influența infecției virale la descendenții celor trei soiuri analizate s-a constatat sporirea numărului coeziunilor interstițiale. Aceste perturbări au condus la creșterea numărului total de chiasme, cu toate că nivelul chiasmelor terminale a variat nesemnificativ.

În rezultatul examenului citologic al microsporogenezei s-a stabilit că fluctuațiile valorilor medii ale chiasmelor sunt generate de modificările tipurilor bivalenților. Similar variantelor martor la loturile experimentale mai frecvent au fost identificați bivalenții de tip „T” și „T + I”. Predominarea acestor tipuri de bivalenți a fost înregistrată și la alte combinații gazdă-patogen [93; 287].

Tabelul 4.7. Valoarea medie a numărului de chiasme per CMP la descendenții de orz obținuți de la plante sănătoase și infectate cu VMDO

Genotipul analizat		Tipul chiasmelor		
		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 este determinat de coeziunile poziționate în regiunile telomerice (Figura 4.5 A, C, E). La descendenții plantelor infectate se atestă schimbări în distribuția chiasmelor interstițiale, precum și inducerea de noi coeziuni sinaptice. Suma totală a chiasmelor la cele trei variante experimentale este dependentă prioritar de bivalenții cu una, două, sau chiar trei chiasme interstițiale de tipul „T+II”, „T+III” (Figura 4.5 B, D, F). Este semnificativ faptul, că la descendenții plantelor infectate, similar variantelor virozate, generarea de noi schimburi de-a lungul brațelor cromozomale a fost însoțită de creșterea univalenților.

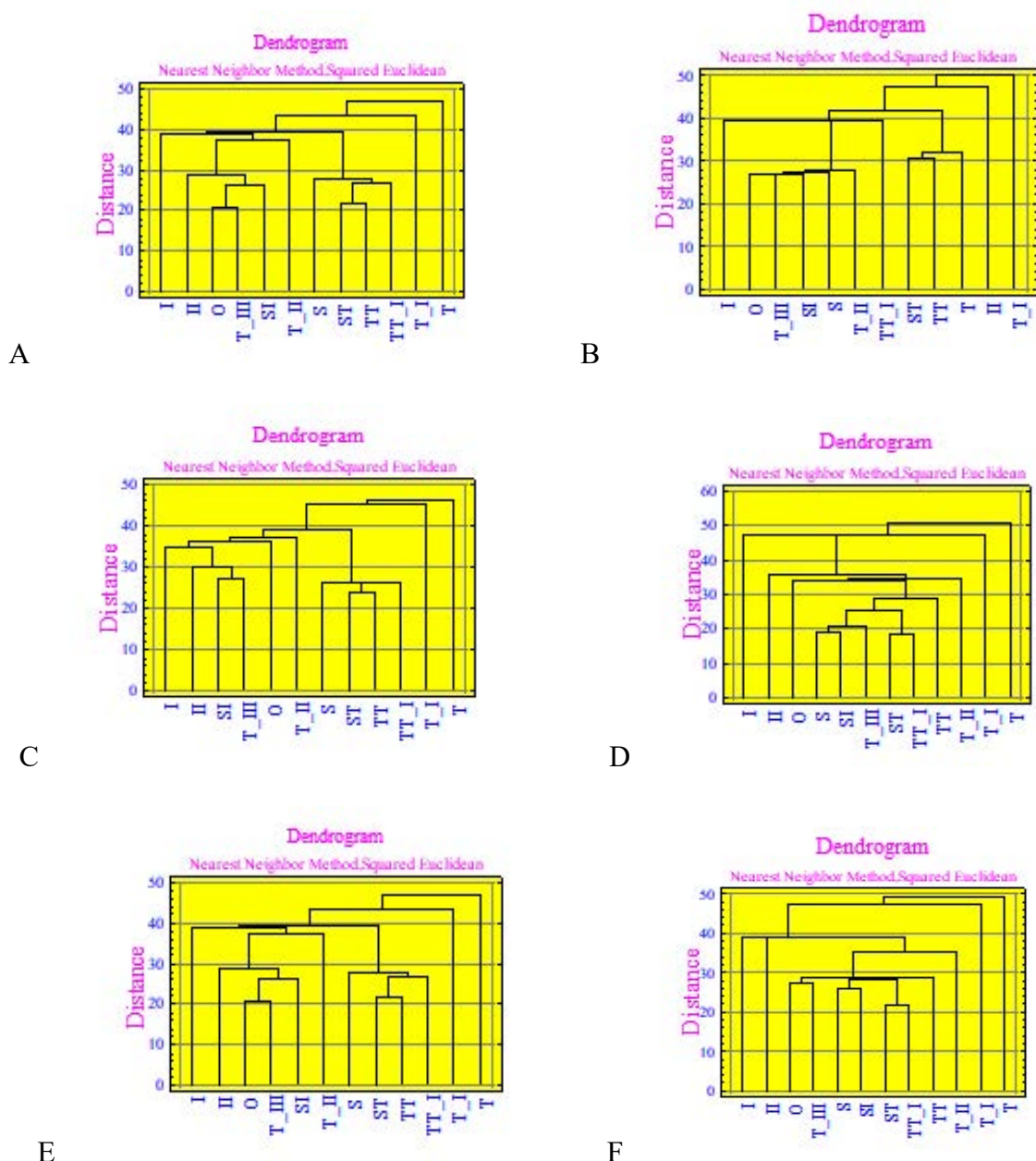


Fig. 4.5. Dendrograma distribuției tipurilor de bivalenți în meiocitele de orz a descendenților plantelor infectate și sănătoase a soiurilor Galactic (A, B), Sonor (C, D), Unirea (E, F). Varianta martor – A, C, E; descendenții plantelor virozate – B, D, E.

În cadrul populațiilor de orz derivate de la plante infectate au fost stabilite modificări în raportul tipurilor de bivalenți. În toate cazurile atestate, a sporit semnificativ cota bivalenților conjugați în poziția terminală și cu două sau trei interstițiale [41]. Potrivit autorilor Korol A. și coaut. [239] bivalenților cu trei coeziuni sinaptice le este atribuit rolul principal în inducerea diversității genetice.

Se știe că factorii care cauzează modificări ale frecvenței *crossing-over*-ului pot fi utilizați ca inductori ai variabilității genetice [239; 463]. Redistribuirea chiasmelor are o mare importanță, deoarece duce la creșterea recombinărilor între genele localizate în aceleași grupuri

de *linkage* [221; 370]. Rezultatele noastre privind efectul VMDO asupra microsporogenezei la plantele de orz susceptibile și descendenții acestora prezintă date confirmative cu privire la perturbarea conjugării meiotice și proprietăților recombinogenetice ale factorului viral.

Creșterea frecvenței recombinării este raportată la plantele de tutun infectate cu VMT [223]. Se sugerează, că în rezultatul interacțiunii dintre gazdă și patogen se produce un semnal sistemic, care conduce la creșterea frecvenței recombinării meiotice și somatice. Semnalul generat la locul infecției este capabil să se răspândească mai repede decât virusul, modificând stabilitatea genomului în țesutul neinfestat [240]. Autorii Filkowski J. și coaut. [139] au presupus o potențială implicare a radicalilor liberi în inducerea efectului sistemic, constatând o sporire semnificativă a recombinărilor în plantele de tutun tratate cu agenți generatori de radicali liberi și radiații electromagnetice ultraviolete.

În ultimele decenii s-au obținut rezultate ce au contribuit la evaluarea mecanismelor recombinării meiotice. Studiile privind desfășurarea *crossing-over*-ului la mutanții meiotici denotă că frecvența și distribuția schimburilor sinaptice sunt sub control genetic strict.

Odată cu înregistrarea progreselor în înțelegerea mai completă a structurii și funcției genomului la plante, s-a făcut avansări în înțelegerea și aprecierea controlului recombinărilor meiotice [37].

Conform unor autori, între rata recombinării și structura cromozomilor (dimensiuni, mărimea brațelor, distanța de la centomer sau telomeri) [277], structura și compoziția cromatinei (conținutul bazelor GC, secvențelor înalt repetitive, elementelor transpozabile) este stabilită o corelație slabă [426].

Pentru mai multe specii de plante este descrisă o frecvență diferită a recombinării de-a lungul cromozomului [36; 84]. De asemenea, la plante este constatată prevalarea recombinării meiotice în regiunile transcriptibil active și lipsa schimburilor în regiunea centromerică. Totodată, pentru grâu, porumb și orz este stabilită creșterea recombinării pe măsura îndepărtării de la centromer [citată după 293]. Rezultate similare au fost obținute și la orez [Kao et al., 2006]. În baza descrierii complete a hărții cromozomului 4 la *A. thaliana* au fost aduse date privind lipsa unui gradient de descreștere al valorii frecvenței recombinării de la centromer spre telomeri [125]. Autorii constată lipsa corelației dintre rata recombinării și distribuirea genelor active, precum și a elementelor transpozabile.

La plante, asemenea multor altor eucariote superioare, este constat prevalarea recombinării în regiunilor bogate în gene, reducerea frecvenței *cross-over*-ilor spre telomere și lipsa recombinării în regiunea centromerelor. Pentru mai multe specii de plante sunt descrise

deosebiri după rata frecvenței recombinării între cromozomi. La tomate o rată mai înaltă este stabilită pentru cromozomii 7 și 8 [84].

Numărul de chiasme per cromozom este determinat de două reguli generale: conjugarea corectă a cromozomilor și interferența alelelor [293]. Se consideră, că reprimarea recombinării între secvențele înalt repetitive protejează genomul de rearanjamente.

Un interes deosebit prezintă mecanismul ce controlează acest proces. Prezența unor *site-uri* specifice recombinării au fost descrise anterior la *Saccharomyces cerevisiae* și *S. pombe* și ulterior pentru alte organisme [225], inclusiv plante [293]. La *S.cerevisiae* *site*-urile specifice recombinării nu sunt distribuite uniform de-a lungul cromozomilor, domeniile fierbinți fiind plasate mai departe de centromere și telomere. La eucariote, inclusiv plante, schimburile *cross-over* nu se produc pe toată lungimea cromozomilor [293]. *Site*-urile specifice recombinării nu sunt conservative și necesită a fi studiate pentru fiecare specie de plante [123].

Totodată, datele privitor la recombinarea la plantele sunt insuficiente, iar reacțiile specifice asociate infecțiilor virale stabilite un cazul interacțiunile compatibile sunt mult mai complicate și cu multe mai ambiguități.

4.3. Estimarea citogenetică a microsporogenezei la plantele de tomate și orz în condiții de patogeneză virală

4.3.1. 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 acestei probleme au fost acordate studii sporadice, conform cărora se semnalează influența infecțiilor virale asupra sferei reproductive la diverse specii de plante. Rezultatele cercetărilor experimentale realizate în carul laboratorului *Biotehnologii vegetale* pe parcursul ultimilor două decenii denotă cert influența unor virusuri, în particular a VMT, asupra diferitelor etape ale meiozei [452]. Datele acumulate privitor la impactul infecțiilor virale asupra regularității microsporogenezei indică necesitatea studierii detaliate a particularităților diviziunilor în dependență de specificul sistemului gazdă-patogen. În vederea aprofundării cercetărilor referitor la aspectele citogenetice ale patogenezei virale prezintă interes studierea influenței germenilor virali în complex și/sau comparativ cu alți factori, cum ar fi radiațiile gama, modul de acțiune al cărora asupra materialului genetic este amplu studiat. Un interes deosebit prezintă studierea microsporogenezei la tomatele afectate de aspermie, o boală virală ce induce modificări substanțiale ale organelor sferei reproductive. Conform unor rezultate anterioare, VAT reduce

semnificativ capacitatea germinativă a polenului, cauzând perturbări semnificative ale funcționalității gametofitului masculin [7].

În baza analizei citogenetice a meiozei la soiurile Nistru, Prizior și Fachel s-a demonstrat, că la plantele martor procentul celulelor cu aberații a fost relativ mic, variind între 4,2% la soiul Nistru și 5,8% la soiul Fachel (Tabelul 4.8).

Tabelul 4.8. Frecvența anomaliilor meiotice la tomate în cazul infectării cu VAT, %

Genotip	Variantă	Faza diviziunii meiotice	CMP cu anomalii, %	Tipul anomaliilor meiotice		
				Eliminări	Retardări	Punți
s. 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	-
s. 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	-
s. 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 $P \leq 0,001$.

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 (Figura A 4.3).

Studiul citologic al microsporogenezei a evidențiat modificări cu o distribuție diferită în diviziunea I și II meiotică. Astfel, rata celulelor cu aberații la plantele martor în A-T I a variat între 4,2 % (s. Nistru) și 6 % (s. Fachel). În A-T II procentul CMP anormale față de cel din prima diviziune a fost redus ($P < 0,05$). Date similare sunt comunicate și pentru alte plante, inclusiv tomate [471]. Unii autori explică această reducere prin eliminarea CMP aberante și/sau ca urmare a unor procese de “reparare” a restructurărilor survenite în structura ADN [80; 307].

La plantele infectate cu VAT se atestă creșterea semnificativă a ratei CMP aberante de cca 4,8 ori la s. Fachel și de 6,9 ori la s. Prizior. În diviziunea II acest efect se aprofundează.

În condițiile patogenezei virale, microsporogeneza evoluează deosebit față de condițiile normale. La plantele infectate profaza meiotică s-a desfășurat în perioada acumulării maxime în celulele anterei a agentului viral și destabilizării proceselor intracelulare desfășurate ca urmare a infecției productive. Amplificarea efectului „perturbant” în diviziunea II la plantele

virozate se datora specificului factorului aplicat; respectiv – infecției virale care poate fi considerată o sursă cu acțiune continuă [7].

Posibilitatea inducerii de mutații în cazul infecțiilor virale nu este surprinzătoare, deoarece orice viroză presupune o pătrundere (întrogrăsire) de material genetic străin în celula gazdă [121]. Efecte genetice cauzate de fitovirusi au fost descrise la porumb [76], la sorg [301] și alte specii [77]. Mottinger J. și coaut. [308] au obținut mutații ale genei alcooldehidrogenaza (Adh1) la *Zea mays* prin infectarea acestuia cu virusul mozaicului striat al orzului. Autorii au explicat acest efect mutagen prin inducerea de către infecția virală a unui „*stres citogenomic*” care a mobilizat unii transpozoni ce au produs mutații.

În inducerea leziunilor cromozomale pot fi implicate și proteinele structurale ale virusului (de exemplu, factorul hemolitic/sincitizant în cazul paramixovirusurilor) [30]. Rezultatele experimentale au arătat, că amplexarea și frecvența leziunilor în cazul unei infecții productive sunt semnificativ mai mari.

Schimbările structurale cromozomale se manifestă în diverse faze ale meiozei sub formă de aberații cromozomale. Diferitele tipuri de aberații din metafaze sau anafază-telofază reflectă spectrul de modificări structurale și determină intensitatea efectului mutagen al diferiților factori [307]. Se consideră, că prezența cromozomilor retardatari în A-T I este expresia citologică a unor restructurări de tipul duplicărilor sau deficiențelor [80], iar punțile cromatice se formează în urma inversiilor [291].

Conform rezultatelor cercetărilor citogenetice, în anafaza și telofaza timpurie din I și II diviziune mai frecvent s-au vizualizat eliminări de cromozomi sau cromozomi retardatari (Tabelul 4.8). Punți cromozomale sau cromatidice au fost remarcate numai la plantele virozate ale s. Fachel și cu o frecvență foarte redusă la s. Prizior. Conform unor autori punțile sunt mai frecvente la formele cu înmulțire vegetativă, având rol major în sporirea variabilității genetice [291]. În toate variantele experimentale s-a remarcat prezența a două sau mai multe aberații într-o singură celulă (în cca 35-60% din CMP), ceea ce a determinat accentuarea efectului depresiv.

Anomalii meiotice la tomate sub influența infecției virale și razelor gama. În conformitate cu sarcinile propuse în acest studiu a fost elaborată schema experimentală conform căreia profaza meiotică s-a desfășurat în perioada acumulării maxime a agentului viral în țesuturile anterei. Iradierea lăstărașilor a fost realizată la aflarea butonilor florali în faza meiotică (faza a VI-a a ontogenezei, ce corespunde perioadei de desfășurare a micro- și macrosporogenezei).

Cercetările citogenetice au permis stabilirea, că infectarea plantelor cu VAT sau VXC a cauzat majorarea procentului de CMP aberante. Astfel, în A-T I procentul CMP cu aberații a

crescut de 3,02 – 4,44 ori la s. Fachel și de 3,92 – 3,65 ori la s. Prizior în cazul infectării cu VAT sau VXC corespunzător. De asemenea, se remarcă sporirea frecvenței celulelor cu aberații în urma iradierii cu raze gama în doza de 20 Gy, atât a tomatelor sănătoase, cât și a celor infectate cu virusuri (Tabelul 4.9).

Tabelul 4.9. Frecvența celulelor mamă polinice cu aberații în cazul iradierii tomatelor sănătoase și infectate cu virusuri

Variantă	s. Prizior		s. 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 $P \leq 0,001$.

Conform datelor obținute, efectul particular al VAT sau VXC asupra primei diviziuni meiotice la s. Prizior este practic la același nivel. Iradierea tomatelor sănătoase sau infectate cu virusuri a determinat majorarea semnificativă a procentului celulelor cu aberații în A-T I. În cea de-a doua diviziune meiotică impactul doar al razelor gama este cu cca 60% mai redus. În cazul influenței combinate a radiației și a unuia dintre virusuri, se constată o tendință similară de diminuare a frecvenței CMP aberante în A-T I comparativ cu A-T II, însă cu o amploare mai redusă. Asemenea efect se constată pentru ambele genotipuri și virusuri.

Studiul citologic al meiozei a scos în evidență aberații de tipul: cromozomi retardatari, eliminări de cromozomi, punți cromozomale sau cromatice cu sau fără fragmente. Conform rezultatelor cercetărilor citogenetice în anafaza și telofaza diviziunilor I și II, mai frecvent s-au întâlnit eliminări de cromozomi sau cromozomi retardatari [4]. Autorii Cornforth M. și Bedford J. [102] remarcă eliminările cromozomilor ca cele mai des întâlnite restructurări cauzate de radiațiile ionizante. Punțile cromozomale sau cromatidice cu sau fără fragmente au fost remarcate doar la tomatele infectate cu VAT cu / sau fără radiație (Tabelul 4.10).

Paralel cu creșterea ratei celulelor mamă polinice cu aberații, în cazul s. Prizior infectat cu unul dintre virusurile studiate sau s. Fachel infectat cu VXC se remarcă majorarea semnificativă a microsporocitelor cu două sau mai multe aberații. În cazul s. Fachel, iradierea materialului infectat a indus diminuarea ($P \leq 0,01$) frecvenței CMP cu multiple aberații.

Tabelul 4.10. Frecvența celulelor cu aberații și spectrul anomaliilor meiotice în A-T I în cazul iradierii tomatelor sănătoase și infectate cu virusuri

Genotip	Variantă	CMP analizate (nr.)	CMP normale (nr.)	Tipuri anomalii				Total aberații per celule cu aberații
				Retar-dări	Elimi-nări	Punți	Frag-mente	
s. Prizior	Martor	675	615	18	43	-	-	1,01±0,02
	Raze gama	690	423	117	249	-	-	1,38±0,05***
	VAT	666	459	84	180	9	-	1,35±0,16***
	VAT + radiație	678	216	213	267	-	-	1,05±0,06
	VXC	585	420	108	93	-	-	1,22±0,06***
	VXC + radiație	690	316	141	255	-	-	1,06±0,02
s. Fachel	Martor	684	617	51	39	-	-	1,36±0,11
	Raze gama	762	432	171	285	-	-	1,37±0,07
	VAT	390	276	66	69	5	-	1,30±0,07
	VAT + radiație	762	312	177	327	12	6	1,17±0,10**
	VXC	492	342	144	60	-	-	1,89±1,19***
	VXC + radiație	765	378	174	231	-	-	1,05±0,02***

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

Aplicarea testului Anova a scos în evidență impactul similar al infecției virale și al radiației asupra primei diviziuni meiotice cu o putere de influență de cca 24% și 22%, respectiv (Tabelul 4.8).

Cele două soiuri analizate – Fachel și Prizior, caracterizate prin susceptibilitate față de ambele virusuri, au prezentat o reacție similară la impactul factorilor studiați. Efect statistic confirmat asupra decurgerii diviziunii a doua meiotice la genotipurile analizate a avut numai infecția virală. Perturbările evidențiate în diviziunea a doua la plantele virozate probabil se datorează specificului factorului utilizat, care poate fi considerat drept un factor cu acțiune continuă, persistentă pe durata microsporogenezei.

Acțiunea asociată a celor doi factori (radiației și infecției virale) a cauzat modificări de o amploare diferită decât efectul separat al fiecăruia. Interacțiunea acestor surse de variație prezintă un efect neliniar. Pentru evaluarea impactului comun al factorilor cu interacțiune neliniară sunt propuse mai multe modele matematice. În acest scop cu succes se utilizează coeficientul interacțiunii sinergice k [451], conform căruia s-a stabilit, că între modul de acțiune coorientat al infecției virale și al razelor gama doar în cazul iradierii s. Prizior infectat cu VAT s-a produs efect sinergic ($k_{\text{exp}}=1,12$).

Tabelul 4.11. Analiza varianței frecvenței anomaliilor meiotice la tomatele infectate și supuse iradierii

Sursă variație	Contribuția procentuală a sursei de variație, %	Gradul de libertate	Suma pătratelor	S ²	Testul F	P
A-T I						
A: Genotip	-	1	11,98	11,98	0,05	0,8262
B: Virus	24,37	2	3480,01	1740,01	7,12	0,0029
C: Radiație	22,47	1	3207,90	3207,9	13,12	0,0010
Interacțiune AB	-	2	202,775	101,39	0,68	0,5142
Interacțiune AC	-	1	196,514	196,51	1,32	0,2606
Interacțiune BC	23,22	2	3315,99	1658,0	11,16	0,0003
Total		35	142777,7			
A-T II						
A: Genotip	-	1	174,768	174,768	1,43	0,2413
B: Virus	35,6	2	2213,46	1106,73	9,04	0,0008
C: Radiație	-	1	39,352	39,522	0,32	0,5741
Interacțiune AB	-	2	25,208	12,604	0,17	0,8443
Interacțiune AC	-	1	192,284	192,284	2,6	0,1190
Interacțiune BC	26,3	2	1654,92	827,46	11,18	0,0003
Total		35	6223,94			

Modificări similare ale procesului de microsporogeneză au fost descrise la formele de tomate cu androsterilitate [471]. Perturbări ale procesului de meioză la tomate s-au remarcat, de asemenea, în cazul acțiunii unor factori fizici sau chimici. Rezultatele prezentate au evidențiat faptul, că tipul aberațiilor induse în diverse condiții experimentale a fost asemănător, variind esențial numai frecvența acestor aberații. Se cunoaște faptul, că nu toate rearanjamentele cromozomale influențează starea funcțională a polenului. Astfel, se consideră că eliminările de cromozomi sau cromozomii retardatari, înregistrate în M I sau în M II, nu determină întotdeauna formarea de polen steril. Acest fenomen poate avea loc dacă cromozomii se distribuie în afara fusului de diviziune, formând microspori cu număr neechilibrat de cromozomi [458].

Anomalii meiotice la descendenții tomatelor obținuți de la plante infectate. Studiul citologic al microsporogenezei la descendenții obținuți de la plantele infectate cu agenți virali a scos în evidență un tablou asemănător la toate loturile experimentale. Dacă la plantele martor cota celulelor aberante a constituit 4,98 – 6,21% în A-T primei diviziuni meiotice și 5,02 –

5,18% în cea de-a doua, în populațiile tomatelor obținute de la părinți infectați frecvența devierilor prezenta valori proxime (Tabelul 4.12).

Tabelul 4.12. Frecvența celulelor mamă polinice cu aberații la descendenții tomatelor infectate

Variantă	s. Nistru		s. Prizior		s. Fachel	
	A - T I	A - T II	A - T I	A - T II	A - T I	A - T II
Martor	6,21±1,04	5,18±0,98	4,98±1,44	5,02±0,88	5,68±1,48	5,14±0,84
Descendenți VAT	8,43±3,09	6,54±1,46	5,18±1,26	4,76±1,66	6,22±1,52	4,84±1,78
Descendenți VXC	7,25±2,48	6,38±1,44	6,20±1,52	5,14±1,39	5,86±2,20	5,70±1,34

Impactul infecțiilor virale asupra următoarei generații a avut repercusiuni nesemnificative a procesului de microsporogeneză. Între valorile frecvenței aberațiilor meiotice la variantele experimentale nu au fost atestate devieri cu suport statistic. Cota CMP cu aberații în ambele diviziuni a prezentat doar tendințe de majorare, exprimând fluctuații mai pronunțate.

Spectrul anomaliilor cromozomale estimate în CMP analizate, a inclus prioritar eliminări și retardări cromozomale, și cu frecvență redusă – punți cromozomale cu sau fără fragmente (Tabelul 4.13).

Tabelul 4.13. Rata celulelor normale și spectrul anomaliilor meiotice în A-T I la descendenții tomatelor infectate

Genotip	Variantă	CMP analizate (nr.)	CMP normale (nr.)	Tipuri anomalii				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.

Ca și în variantele plantelor virozate, și la descendenți cel mai frecvent au fost identificate eliminări și cromozomi retardatari. Într-un procent redus, au fost remarcate punți cromatidice fără fragmente și doar numai într-un singur caz, la generația s. Fachel derivată de la plante infectate cu VAT, s-a constatat punte cromatidică însoțită de fragmente.

La multe specii de plante s-a observat, că punțile și fragmentele în meioză pot apărea ca urmare a fragmentărilor și reunirii cromatidelor în timpul profazei meiotice [288]. De asemenea, este sugerat, că devierile *crossing-over*-ului generează punți și fragmente. Potrivit autorilor, punțile cromozomale cu fragmente în anafaza I pot fi formate atunci când cromatidele ne-surori ale cromozomilor omologi sau ne-omologi se rup și capetele proximale rupte se reunesc în forma "U". Fragmentările și perturbările meiozei sunt considerate drept consecințe ale restructurărilor genelor sau a stărilor de dezechilibrare, rezultate din interacțiunea genotipurilor parentale în cazul hibridilor. Gottschlak W. și Kaul M. [163] au explicat fragmentarea cromozomilor, apariția asinapsiei și punților cromatidice ca rezultat al acțiunii pleiotropice a genelor.

Potrivit rezultatelor obținute la descendenți tomatelor virozate, cota celulelor cu aberații în anafaza-telofaza I și II meiotică a prezentat valori comparabile cu varianta martor. Cu toate acestea a fost atestat, că frecvența aberațiilor per celulă este semnificativ mai majoră. Astfel, în A-T I la descendenții s. Nistru derivați de la plantele infectate cu VAT se depistau cu cca 20% mai frecvent meiocite cu 2 și mai multe aberații decât la plantele nesupuse impactului infecției virale. Date similare au fost atestate pentru toate variantele experimentale. Sporirea numărului de aberații în cadrul aceleași celule polinice denotă o instabilitate a procesului de meioză. Eliminările și retardările identificate în anafaza-telofaza timpurie pot conduce la formarea de micronuclei și, respectiv, în devieri ale distribuției uniforme a materialului genetic între celulele fiice.

4.3.2. Anomalii meiotice la plantele de orz infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului și descendenții acestora

Răspunsurile plantelor se bazează pe capacitatea de a recunoaște stresul, inclusiv cel asociat infecțiilor virale, și a produce semnale care pot activa reacții specifice în țesuturile îndepărtate. La soirile de orz analizate în urma infectării cu VMDO s-au stabilit relații compatibile, ceea ce a generat viroza sistemică. Prin metode de diagnostic virusologic (procedeul microscopiei electronice de contrastare negativă), particulele virale au fost depistate în toate părțile vegetale ale plantei, precum și în țesuturile somatice ale anterei. În condiții de patogeneză și stabilire a relațiilor compatibile dintre gazdă și patogen s-au produs rearanjamente morfofuncționale ce au generat semnale și în țesuturile neinfectate cum sunt cele arhesporale.

Conform studiilor citologice ale microsporogenezei la plantele sănătoase, s-a stabilit că cota celulelor normale în I diviziune meiotică variază între 88,9 și 87,3% la soiurile Galactic și Sonor respectiv. În cea de-a doua diviziune se atestă o tendință de reducere a frecvenței celulelor mamă polinice cu aberații (Tabelul 4.14).

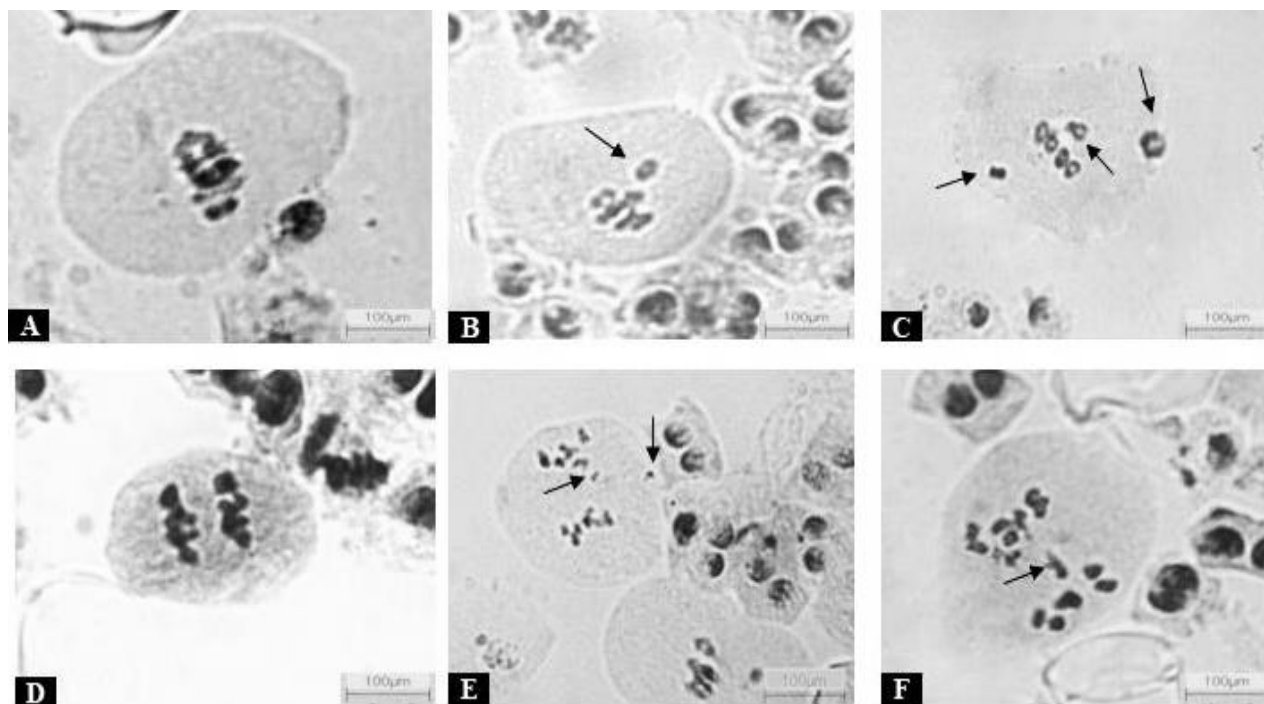
Tabelul 4.14. Frecvența CMP cu aberații la plantele de orz sănătoase și infectate cu VMDO

Genotip	Martor		VMDO	
	A - T I	A - T II	A - T I	A - T II
s. Galactic	11,10±1,51	10,24±1,23	32,89±1,72***	24,37±1,12***
s. Sonor	13,67±1,14	13,58±1,51	36,56±1,34***	31,46±0,89***
s. Unirea	12,13±0,65	10,36±0,45	31,22±1,07***	26,81±1,31***

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

VMDO a condiționat majorarea numărului CMP cu aberații. La s. Galactic cota meiocitelor anormale a fost majorată de 2,9 ori în A-T I și de 2,4 ori în A-T II, comparativ cu martorul. Destabilizarea semnificativă a procesului de meioza în condițiile patogenezei virale a fost raportată și pentru soiurile Sonor și Unirea.

Spectrul aberațiilor atestate a inclus cromozomi retardatari, eliminări de cromozomi sau cromozomi precoci, punți cromozomale sau cromatidice (Figura 4.6).



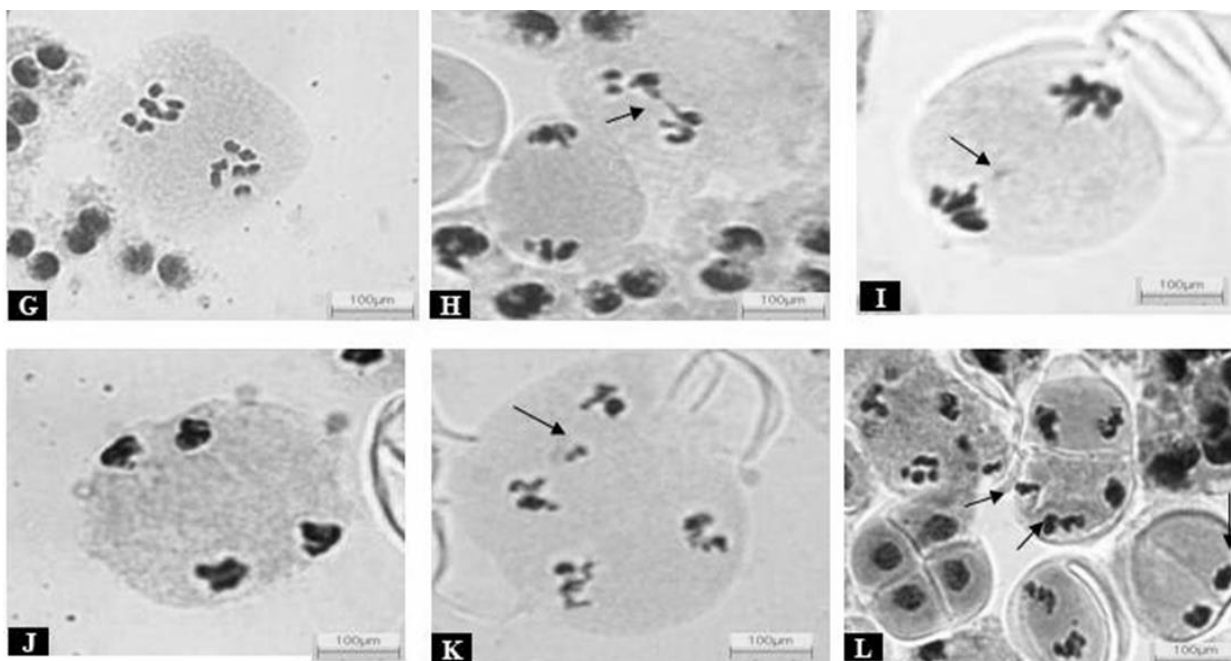


Fig. 4.6. Diviziuni meiotice la orz la diferite etape: A) metafază I normală; B) metafază I cu o eliminare de cromozomi (săgeată); C) metafază I cu cromozomi precoci (săgeată); D) anafază I normală; E) anafază I cu cromozomi precoci și retardatari; F) telofază I cu cromozomi retardatari (săgeată); G) telofază I normală; H) și I) telofază I cu punți cromozomale (săgeată); J) telofaza II normală (săgeată); K) telofaza II cu retardări (săgeată); L) segregarea neechivalentă a cromozomilor (săgeată) (x 600).

Cel mai frecvent au fost identificați cromozomii retardatari sau precoci, cu o rată semnificativ mai redusă la martor. Perturbările conjugării cromozomilor omologi au favorizat clivarea anormală a cromozomilor, ceea ce a condus în etapele ulterioare la retardarea sau eliminarea precoce a cromozomilor [45]. Destabilizarea segregării se consideră a fi rezultatul desinapsiei și formării de univalenți, dar și a dereglărilor aparatului mitotic, responsabil în distribuția echivalentă a materialului genetic între celulele fiice [475].

Anomalii meiotice la descendenții soiurilor de orz obținute de la plante infectate. Investigațiile citologice ale descendenților de orz obținute 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 (Tabelul 4.15).

Similar tabloului citologic stabilit la descendenții plantelor virozate de tomate, în studiul impactului VMDO asupra microsporogenezei la orz, devierile frecvenței celulelor anormale nu au fost confirmate statistic. Cu toate că cota CMP cu aberații a deținut valori similare, în variantele experimentale a celor trei soiuri de orz analizate a fost descrisă prezența mai multor

tipuri de anomalii într-un singur meiocit. Sporirea aberațiilor meiotice per celulă anormală în A-T I a avut suport statistic cu o mărire de 8,14 și 20% respectiv la soiurile Unirea, Galactic și Sonor.

Tabelul 4.15. Procentul celulelor normale și spectrul anomaliilor meiotice în A-T I la descendenții soiurilor de orz infectate cu VMDO

Genotip	Variantă	CMP analizate (nr.)	CMP normale (nr.)	Tipuri anomalii				Total aberații per celule aberante
				Retar-dări	Eliminări	Punți	Fragmente	
s. Galactic	Martor	635	571	31	37	-	-	1,06±0,03
	Descendenți VMDO	580	514	29	48	3	-	1,21±0,05**
s. Sonor	Martor	710	638	34	41	-	-	1,04±0,05
	Descendenți VMDO	742	655	47	62	-	-	1,25±0,08*
s. Unirea	Martor	660	587	39	40	-	-	1,08±0,01
	Descendenți VMDO	674	592	42	54		-	1,17±0,03*

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

Aplicarea analizei varianței a scos în evidență impactul infecției virale în destabilizarea proceselor nu doar în anafaza-telofaza I, dar și asupra celor de segregare a materialului genetic în cea de-a doua diviziune meiotică (Tabelul 4.16).

Tabelul 4.16. Analiza varianței frecvenței anomaliilor meiotice la descendenții de orz obținuți de la plante infectate

Sursa de variație	Grad de libertate	Suma pătratelor	S^2	Testul F	P
A-T I					
A: Genotip	2	12,854	12,854	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			
A – T II					
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 la soiurile analizate de orz nu depinde de genotip. Infecția produsă de VMDO a condus la destabilizări care s-au menținut și la descendenții sănătoși ai plantelor infectate.

Efecte genetice produse de infecția virală sunt raportate de Dong X. [121] la plantele de tutun infectate cu VMT. Autorul remarcă o creștere a rearanjamentelor ADN-ului la descendenții plantelor infectate, indicând faptul, că recombinarea indusă de patogen poate duce la adaptări ereditare la stres.

4.4. Regularitatea diviziunilor meiotice la tomate și orz în condiții de patogeneză virală

Fiecare microspor poate fi privit ca o unitate morfofuncțională 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.

Datorită sensibilității sporite față de diferiți factori ambientali, inclusiv viroze, etapa de formare a organelor reproductive este considerată cea mai critică în dezvoltarea plantei [172].

4.4.1. Aspectul morfologic al tetradelor în anterele plantelor de tomate și orz infectate cu virusuri

Printre metodele citogenetice, evaluarea microsporogenezei în baza etapei de tetrade constituie una clasică și uzuală în soluționarea diferitelor probleme ale biologiei aplicate. Conform [141; 177], tetradele constituie un model de perspectivă în studierea mutațiilor meiotice, regularității diviziunilor celulare, reprezentând expresia morfologică primară a anomaliilor meiotice produse.

Analiza tetradelor, similar testului micronucleic, poate fi aplicată în aprecierea genotoxicității diferitelor substanțe chimice și factorilor poluanți (pesticide, metale grele, radionuclizi etc.) [297].

Potrivit mai multor autori, înțelegerea deplină a evenimentelor desfășurate în meioză poate fi mai ușor contemplată în baza evaluării produsului diviziunilor meiotice – tetradelor.

Conform datelor studiului citologic al etapei de tetrade au fost relevate diferențe apreciabile ale microsporogenezei la plantele de tomate și orz sănătoase și cele infectate cu virusuri. Eliminarea cromozomilor în afara fusului de diviziune și separarea neechilibrată a cromozomilor în A-T II a contribuit la formarea de sporade anormale (monade, diade, triade

precum și poliade). Infectarea plantelor cu VAT a favorizat o distribuție neechilibrată a materialului genetic între celulele fiice și formarea de sporade anormale (Figura 4.7).

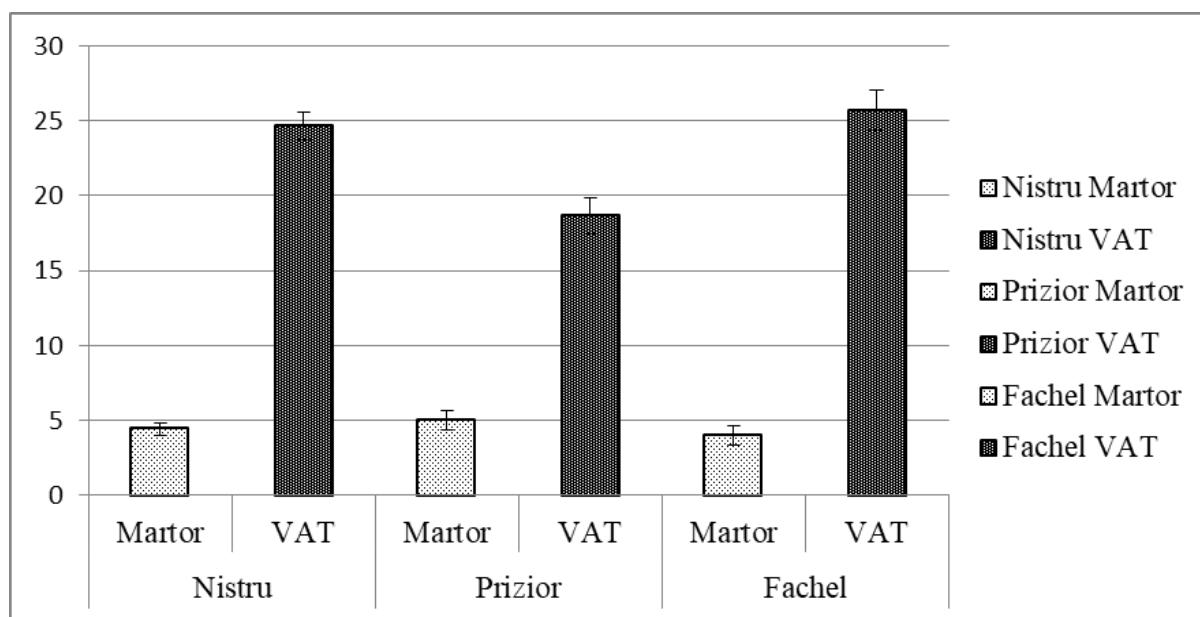


Fig. 4.7. Celule cu distribuții neechivalente ale cromozomilor la plantele de tomate sănătoase și infectate cu VAT, %.

La plantele martor, frecvența CMP cu distribuție neuniformă a variat între 4,0 și 5,01% (la soiurile Fachel și Prizior); în cazul plantelor infectate cu aspermie acest procent a crescut de 3,7 ori la soiul Prizior și de 6,4 ori la soiul Fachel. Conform rezultatelor obținute, în antele plantelor martor tetradele au constituit peste 80% din totalul sporadelor.

Infecția virală a favorizat formarea poliadelor (în special pentadelor) și diadelor; mai puțin a monadelor (Tabelul 4.17). Diferențe semnificative s-au observat în nivelul ratei triadelor (uniforme și neuniforme). Aceste modificări au fost deosebit de evidente la soiul Fachel, la care au atins rata de peste 37 %.

În antele soiurilor de tomate sănătoase, rata tetradelor morfologic normale a fost în jur de 95-96%. VAT similar VXC, a indus reducerea tetradelor cu peste 20% la toate cele trei soiuri analizate. Infectarea tomatelor cu viroze a avut drept consecință sporirea cotei sporadelor anormale (monadelor, diadelor, triadelor, precum și poliadelor), frecvența cărora la plantele sănătoase era destul de redusă (4-5 %). Ambele virusuri au condus la majorarea semnificativă atât a monadelor și diadelor, cât și a poliadelor. Repercusiuni similare au fost înregistrate și la soiurile de orz de primăvară infectate cu VMDO. Trebuie de remarcat, că la orz, comparativ cu tomatele, a fost atestat un procent mai sporit al monadelor și diadelor [1].

Tabelul 4.17. Frecvența sporadelor anormale la soiurile de tomate și orz de primăvară, sănătoase și infectate cu virusuri

Genotip	Varianta	Tipul sporadelor				
		Monade	Diade	Triade	Tetrade	Poliade
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)						
s. Fachel	martor	0,06±0,04	0,20±0,12	2,83±0,06	96,53±0,63	0,38±0,10
	VAT	0,66±0,09 ***	2,06±0,16 ***	21,23±0,44 ***	71,36±0,94 ***	4,69±0,39 ***
	VXC	0,47±0,08 ***	1,52±0,17 ***	21,10±0,75 ***	73,65±0,30 ***	3,25±0,27 ***
s. Nistru	martor	0,23±0,01	0,39±0,21	2,71±0,10	96,20±0,16	0,46±0,01
	VAT	1,04±0,08 ***	2,07±0,49 ***	22,30±0,21 ***	70,53±0,84 ***	4,08±0,52 ***
	VXC	0,75±0,09 ***	1,17±0,05 ***	22,98±0,34 ***	73,26±0,35 ***	1,85±0,12 ***
s. Prizior	martor	0,39±0,05	0,71±0,03	2,95±0,03	95,36±0,23	0,59±0,14
	VAT	1,53±0,20 ***	1,92±0,14 ***	23,19±1,26 ***	71,28±0,99 ***	2,06±0,06 ***
	VXC	0,85±0,15 **	1,03±0,92 ***	23,37±0,31 ***	72,87±0,48 ***	1,87±0,13 ***
Orz de primăvară (<i>Hordeum vulgare</i> L.)						
s. Galactic	martor	2,49±0,17	1,81±0,18	1,24±0,09	93,58±0,44	0,88±0,16
	VMDO	5,35±0,18 ***	12,13±0,64 ***	5,91±0,49 ***	72,28±1,06 ***	4,32±0,22 ***
s. Sonor	martor	1,42±0,14	1,58±0,22	0,91±0,06	95,19±0,31	0,89±0,28
	VMDO	4,63±0,42 ***	8,41±0,21 ***	4,75±0,09 ***	79,51±0,28 ***	2,69±0,16 ***
s. Unirea	martor	1,48±0,09	1,44±0,18	1,13±0,08	95,16±0,35	0,79±0,07
	VMDO	4,91±0,40 ***	10,22±0,18 ***	5,31±0,21 ***	76,07±1,41 ***	3,49±0,23 ***

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

Specific pentru tomate este formarea simultană a microsporilor și distribuirea lor tetraedrică, iar pentru orz – succesivă cu repartizare izobilaterală (Figura 4.8). Este cunoscut faptul, că la speciile cu tip succesiv de formare al microsporilor, monadele pot apărea ca rezultat al blocării citochinezei după prima diviziune meiotică. Cauzele inducerii monadelor sunt asociate cu dereglările fusului de diviziune și fragmoplastului, precum și a membranelor celulare. În urma examinării microsporogenezei de tip succesiv și simultan, Шамина Н. [490] concluzionează, că prima diviziune meiotică poate finaliza cu asemenea produși anormali cum sunt monadele uni- și polinucleate, monadele perforate, diadele. Formarea diadelor și a monadelor perforate este rezultatul inițierii sau chiar a realizării citochinezei după telofaza I, în timp ce monadele mononucleate apar în urma blocării formării fusului de diviziune în metafaza I, iar a monadelor polinucleate (cu 3 și mai mulți micronuclei) – ca rezultat al formării fusului de diviziune poliarcal sau distribuirii haotice a firelor fusului de diviziune.

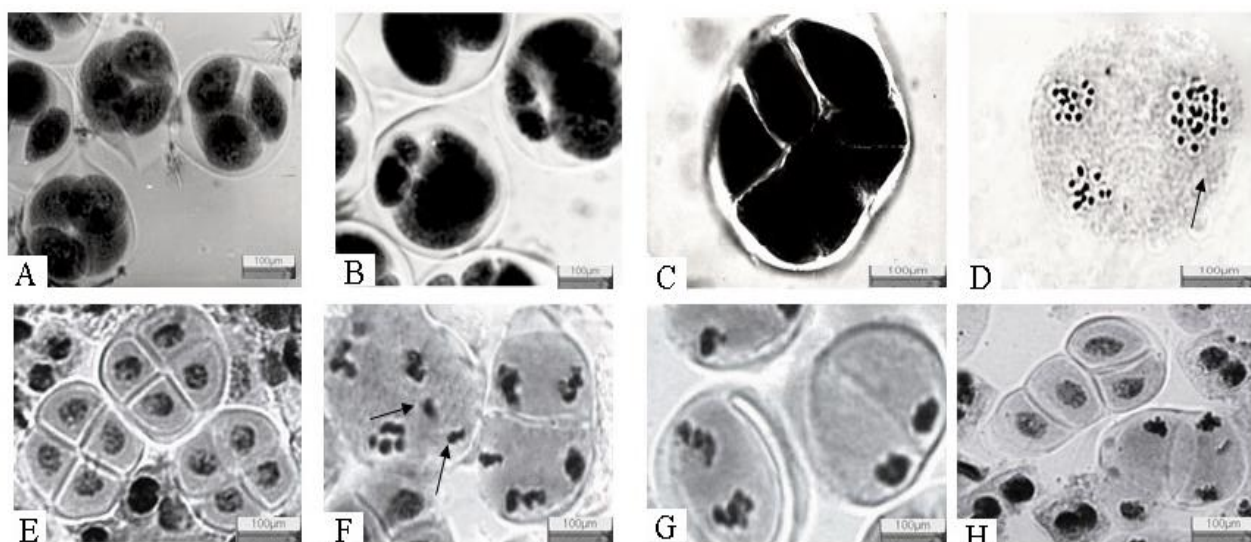


Fig. 4.8. Rezultatul microsporogenezei la soiurile de tomate și orz: A) tetrade normale la s. Fachel; B) tetrade cu microspori neechivalenți (indicați cu săgeți) la s. Fachel infectat cu VAT; C) poliadă; D) Telofaza II cu distribuții neechivalente de cromozomi; E) tetrade normale la orz, s. Galactic; 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).

Diadele sunt produse normale ale primei diviziuni meiotice la plantele cu microsporogeneză succesivă (de ex. orzul), în timp ce la speciile cu formare simultană a microsporilor (tomatele) – sunt rezultatul declanșării timpurii a citochinezei. Diadele la sfârșitul telofazei II, pentru ambele tipuri de sporogeneză reprezintă o anomalie.

Atât la mono-, cât și dicotiledonate, triadele apar ca rezultat al aneuploidiei. De asemenea poliadele sunt aneuploide, ca efect al segregării neechivalente a cromozomilor [490]. La speciile cu microsporogeneză succesivă poliadele se constată cu frecvență mai redusă. Se consideră, că apariția micronucleelor la aceste plante duce mai frecvent la formarea monadelor, diadelor, triadelor polinucleate, ceea ce a fost constatat și în cercetările noastre la soiurile analizate de orz. La tomate, comparativ cu orzul, frecvența poliadelor a fost mai majoră. Potrivit unor autori formarea monadelor, diadelor și triadelor este rezultatul orientării anormale a fusului de diviziune [58]. Astfel, suprapunerea firelor fusului acromatic în metafaza II conduce la apariția diadelor, iar aranjarea lor tripolar, sub un unghi de 60^0 (în forma Y) în anafaza II, cauzează formarea triadelor.

Ca rezultat anormal al microsporogenezei la plantele de orz infectate cu VMDO a fost atestată și prezența tetradelor de tip T (Figura 4.9 H). Shimamura M și coaut. [382] 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.

Pentru orz, comparativ cu tomatele în cazul infectării cu fitovirusuri a fost remarcată prevalarea anomaliilor generate de rearanjamente ale fusului de diviziune meiotică. În corespundere cu schema experimentală, la ambele culturi profaza I meiotică s-a desfășurat în perioada acumulării maxime a germenilor virali în antere. Virionii virusurilor VAT, VXC, dar și VMDO se concentrează în cantități majore în celulele endoteciului, tapetului, fiind lipsă în microspori. Pentru VMDO se cunoaște capacitatea de a penetra și propaga prin celulele sporale, dar această însușire este în dependență de genotipul gazdei și tulpina virusului și nu a fost stabilită în sistemele gazdă-virus analizate de noi. Anomaliile descrise survin ca rezultat al procesului de patogeneză virală prin modificări ale țesuturilor trofice ale anterei, inductoare de restructurări ale cromozomilor [4] și polen anormal. Spectrul anomaliilor stabilite ca rezultat al diviziunilor meiotice la orz a fost similar celui descris la tomate. Infecția provocată de VMDO la soiurile sensibile de orz de primăvară, a contribuit cu o putere mai accentuată la sporirea restructurărilor asociate de fusul de diviziune și procesele de citochineză. Pentru virionii acestui virus este stabilită formarea unui complex de ribonucleoproteine care conține genomul viral și ARN-uri de mesaj, implicate în propagarea sistemică a virusului și dezvoltarea procesului de patogeneză [260].

4.4.2. 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 [160]. 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 [183]. Ținând cont de această diferență pentru studiile citologice a fost utilizată doar partea de mijloc a anterelor, vârful și baza fiind înlăturate.

În corespundere cu datele evaluărilor citologice, s-a stabilit, că infecțiile virale au produs o accentuare a asincronismului. Astfel, dacă în anterele plantelor sănătoase prevalau CMP în profaza I, în anterele cu lungime proximă ale plantelor infectate cu virusuri predominau microsporiile la diferite etape, tetradele fiind majoritare (Figura 4.9). Eterogenitatea microsporiilor în cadrul aceleiași microsporangiu se consideră a fi consecința asincronismului proceselor meiotice [147].

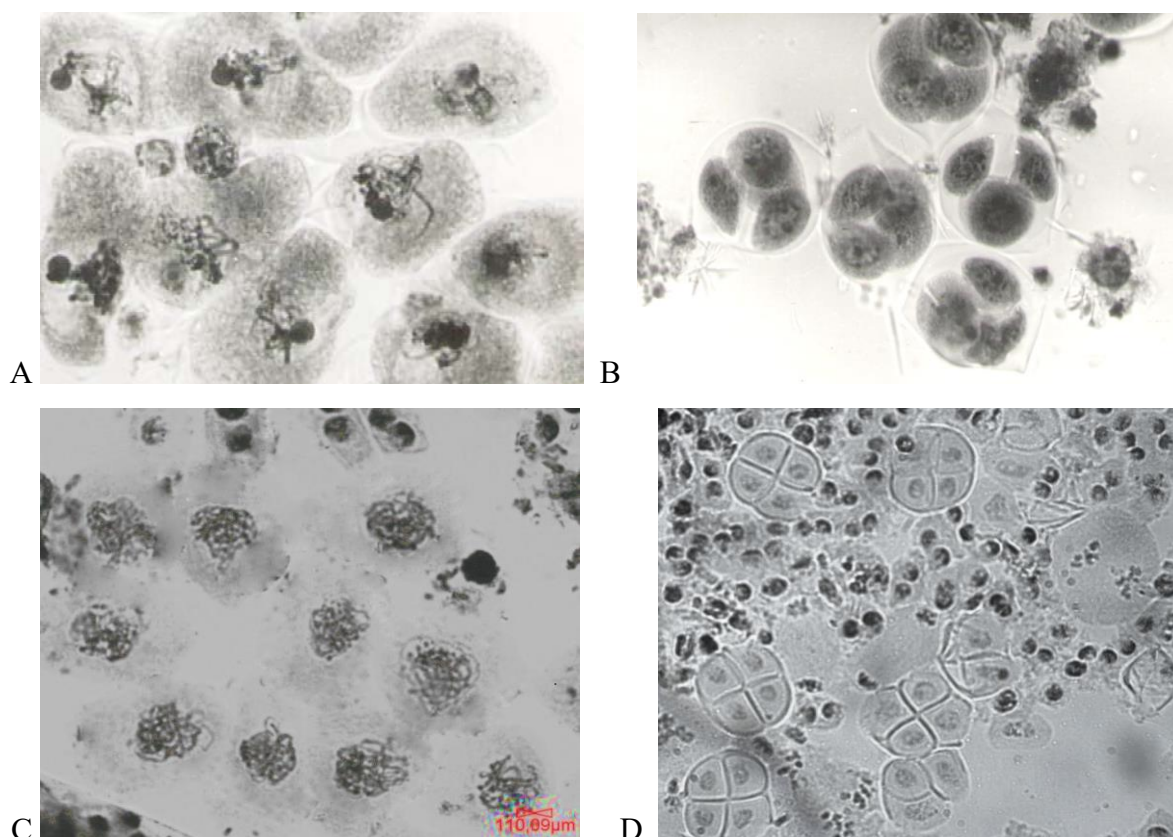


Fig. 4.9. Celule microsporale în anterele de tomate (A, B) și orz (C, D): A) CMP la etapa de leptoten în anterele plantelor martor, s. Fachel, lungimea anterei 2 mm; B) microspori la etapa de tetrade în anterele plantelor infectate cu VAT, lungimea anterei 2 mm; C) meiocite la etapa de leptoten în anterele plantelor martor, s. Galactic; D) microspori la etapa de tetrade în anterele plantelor infectate cu VMDO (x 400).

Investigațiile citologice ale anterelor tomatelor infectate cu virusuri denotă sporirea asincronismului, dar și modificarea interdependenței dintre lungimea anterei/fază meiotică (Tabelul 4.18). Aceste constatări 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.

Tabelul 4.18. Procentul CMP la diferite etape ale diviziunii meiotice la plantele de tomate sănătoase și infectate cu virusuri

Genotip	Variantă	Lungimea medie a anterei, mm	Numărul de CMP analizate	CMP în dependență de etapele fazei meiotice			
				Profaza I	Metafaza I Anafaza I Telofaza I	Metafaza II Anafaza II Telofaza II	Tetrade
s. Fachel	martor	1,99±0,02	3840	67,2	29,2	3,6	-
	VAT	1,98±0,04	2554	4,7	9,6	31,1	54,6
	VXC	1,96±0,05	3875	12,4	16,0	24,9	46,7
s. Nistru	martor	2,04±0,05	4110	62,4	22,4	15,2	-
	VAT	2,02±0,04	3468	7,2	12,5	36,8	43,5
	VXC	1,99±0,06	4218	17,1	23,2	28,5	41,2

s. Prizior	martor	2,07±0,06	5046	56,7	28,2	15,1	-
	VAT	2,06±0,05	4654	6,8	13,4	38,4	41,4
	VXC	2,02±0,07	4857	12,1	17,3	31,0	39,6

Date similare au fost obținute și pentru soiurile de orz de primăvară infectate cu VMDO (Tabelul 4.19). În condiții normale, procesul de meioză la orz, comparativ cu tomatele, decurge mult mai sincronizat. Analiza procesului de microsporogeneză la plantele de orz de primăvară a pus în evidență inducerea sporită a microsporilor cu anomalii ca rezultat al infectării cu VMDO, dar și accelerarea diviziunilor meiotice.

Tabelul 4.19. Frecvența CMP în dependență de fazele diviziunii meiotice la plantele de orz de primăvară sănătoase și infectate cu VMDO

Genotip	Variantă	Numărul de CMP analizate	CMP în dependență de etapele fazei meiotice			
			Profaza I	Metafaza I Anafaza I Telofaza I	Metafaza II Anafaza II Telofaza II	Tetrade
s. Galactic	martor	3860	78,6	15,3	6,1	-
	VMDO	4368	8,4	24,4	19,7	47,5
s. Sonor	martor	5046	82,1	16,1	1,8	-
	VMDO	4654	10,5	5,1	23,4	61,0
s. Unirea	martor	4320	73,9	12,7	12,2	1,2
	VMDO	5026	7,5	11,4	34,3	46,8

Sincronizarea diviziunilor celulare este sub control genetic [257; 420], iar periodicitatea poate fi influențată de multiple procese, care se stabilesc de la primele etape. Factorii externi de stres pot favoriza evaluarea proceselor specifice meiozei. În desfășurarea evenimentelor microsporogenezei se atestă diferențe la diferite etape, iar acestea pot fi apreciate și cuantificate [396]. Pentru meioza de tip simultan dezvoltarea este sincronizată până la diviziunea I și, uneori, până la cea de-a II-a. Se consideră, că diviziunea II se petrece asincron atât la speciile cu tip succesiv [133; 400], cât și pentru cele cu tip simultan [263; 414]. La majoritatea speciilor, sincronizarea desfășurării etapelor meiotice se produce după formarea tetradelor. Se consideră, că aceasta este legat cu activarea enzimelor implicate în digerarea membranei de caloză.

Conform unor opinii asincronismul conduce la formarea polenului steril [226] sau la gameți cu număr de cromozomi neechilibrat [69; 156]. În general, asincronismul este considerat ca o anomalie meiotică [432].

Concluzii la Capitolul 4

1. În rezultatul stabilirii procesului productiv de patogeneză la infectarea tomatelor și orzului cu virusuri se produc modificări ale microsporogenezei ce implică recombinarea meiotică prin sporirea legăturilor sinaptice și schimburilor reciproce, perturbarea coeziunilor dintre cromozomii omologi și formarea de univalenți.

2. Evaluarea microsporogenezei la plantele de tomate infectate cu virusul aspermiei de tomate sau X al cartofului și de orz infectate cu virusul dungat al orzului a scos în evidență abateri în conjugarea cromozomilor omologi, distribuirea inegală a materialului genetic, exprimate prin redistribuirea schimburilor cromatidice, inducerea de noi coeziunii sinaptice, în special în regiunile interstițiale. Impactul infecției virale asupra frecvenței *crossing-over*-ului meiotic a deținut o putere de influență comparativă cu razele gama în dependență de doză.

3. Analiza citologică a microsporogenezei a evidențiat majorarea frecvenței aberațiilor meiotice la soiurile de tomate în cazul infectării cu VAT, VXC, iradierii cu raze gama, precum și la soiurile de orz de primăvară infectate cu VMDO. La plantele virozate s-a constatat o creștere substanțială a aberațiilor cromozomale de tipul cromozomi precoci, retardatari, mai rar punți cu sau fără fragmente; distribuție neuniformă a materialului genetic între celulele mamă polinice; sporirea procentului de sporade anormale. Tipurile aberațiilor cromozomale constatate sunt similare celor stabilite în urma acțiunii radiației gama, precum și celor descrise în literatură în cazul androsterilității.

4. Repercusiunile induse de infecțiile virale asupra procesului de meioză au prezentat oscilații diferite; astfel razele gama au deținut o putere de influență mai accentuată în I diviziune meiotică, iar infecția virală a cauzat un efect mai semnificativ în diviziunea a doua meiotică.

5. Ca rezultat al infectării cu virusuri a plantele de tomate și orz de primăvară are loc sporirea tetradelor anormale: creșterea esențială a monadelor, diadelor, triadelor și poliadelor, ca rezultat tangibil androsterilității. Anomaliile descrise reflectă impactul infecțiilor virale asupra proceselor de segregare a cromozomilor, formării și orientării elementelor fusului de diviziune, precum și a procesului de citochineză.

6. Efectele destabilizatoare ale meiozei provocate de infecțiile virale la tomate și orz au generat repercusiuni la descendenții liberi de infecție, cauzând modificări mai accentuate în recombinarea meiotică fiind raportată redistribuirea schimburilor omoloage în regiunile interstițiale și sporirea coeziunilor sinaptice concomitent cu majorarea numărului de univalenți. Amplitudinea devierilor microsporogenezei a fost specifică fiecărui sistem gazdă-patogen.

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

Stresul biotic este unul dintre cele mai complexe stresuri pentru plante, care implică diferite mecanisme de toleranță, rezistență și compatibilitate [73]. Rezistența include componenta genetică care are la bază capacitatea gazdei de a împiedica specific invazia, reproducerea și propagarea agenților patogeni, în timp ce toleranța reprimă exprimarea simptomelor și moderează efectul patogenului [110; 215].

Infecțiile compatibile sau incompatibile generează diverse molecule de semnalizare, inclusiv speciile reactive de oxigen (SRO). Producția inițială de radicali liberi induce în primele ore un semnal al recombinației sistemice (SRS), care ulterior determină formarea acidului salicilic (AS), în special în sistemele incompatibile, în care conduc la o erupție de SRO ca parte a răspunsului de hipersensibilitate sau ca semnal al rezistenței sistemice dobândite [271]. În interacțiunile compatibile se produc SRS ceea ce se reflectă asupra frecvenței recombinației [73].

Cele mai obișnuite SRO includ oxigenul singlet ($^1\text{O}_2$), radicalul superoxid (O_2^-), peroxidul de hidrogen (H_2O_2) și radicalul hidroxil ($\text{OH}^\cdot$), care sunt foarte reactive și toxice, și pot determina distrugerea oxidativă a celulei [88; 299]. SRO sunt generate în diferite organite subcelulare cum ar fi cloroplastele, mitocondriile și peroxizomii datorită activității metabolice desfășurate în aceste compartimente [299]. În calitate de surse de SRO de asemenea, pot servi membranele plasmatică, apoplastul, reticulul endoplasmatic, citosolul, precum și matricea extracelulară, însă mitocondriile, cloroplastele și peroxizomii, care dețin lanțuri transportatoare de electroni, sunt considerate cele mai importante organite implicate în generarea SRO [298].

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 [449]. În acest scop în cercetare au fost incluse soiurile de tomate Craigella (Tm-2²/Tm-2²) și Craigella (Tm-1/Tm-1), deținătoare de gene de rezistență la VMT, specia spontană *S. pimpinellifolium*, ce a exprimat toleranță, și soiul Elvira susceptibil la infectare cu virusurile VMT sau VAT.

Conform rezultatelor examenului structural a fost depistată prezența virionilor VMT în citoplasma s. Elvira, varietății *S. pimpinellifolium* infectate. Cât privește particulele VAT, acestea s-au remarcat în toate sistemele analizate indiferent de tipul reacției.

Reorganizările intracelulare au purtat un gradul de expresie dependent de reacția gazdei la patogen: rezistență, toleranță sau susceptibilitate [47]. În cazul soiurilor Craigella (Tm-2²/Tm-2²) și Craigella (Tm-1/Tm-1), la infectarea cu VMT structura internă și organizarea ultrastructurală a organelor celulare a suferit modificări mai puțin apreciabile (Figura 5.1). Plastidele și mitocondriile au prezentat aspecte tipice matorului. La infectarea cu VMT se remarcă multiple mitocondrii cu criste bine dezvoltate, dar și un număr sporit de peroxizomi (Figura 5.1 B, F).

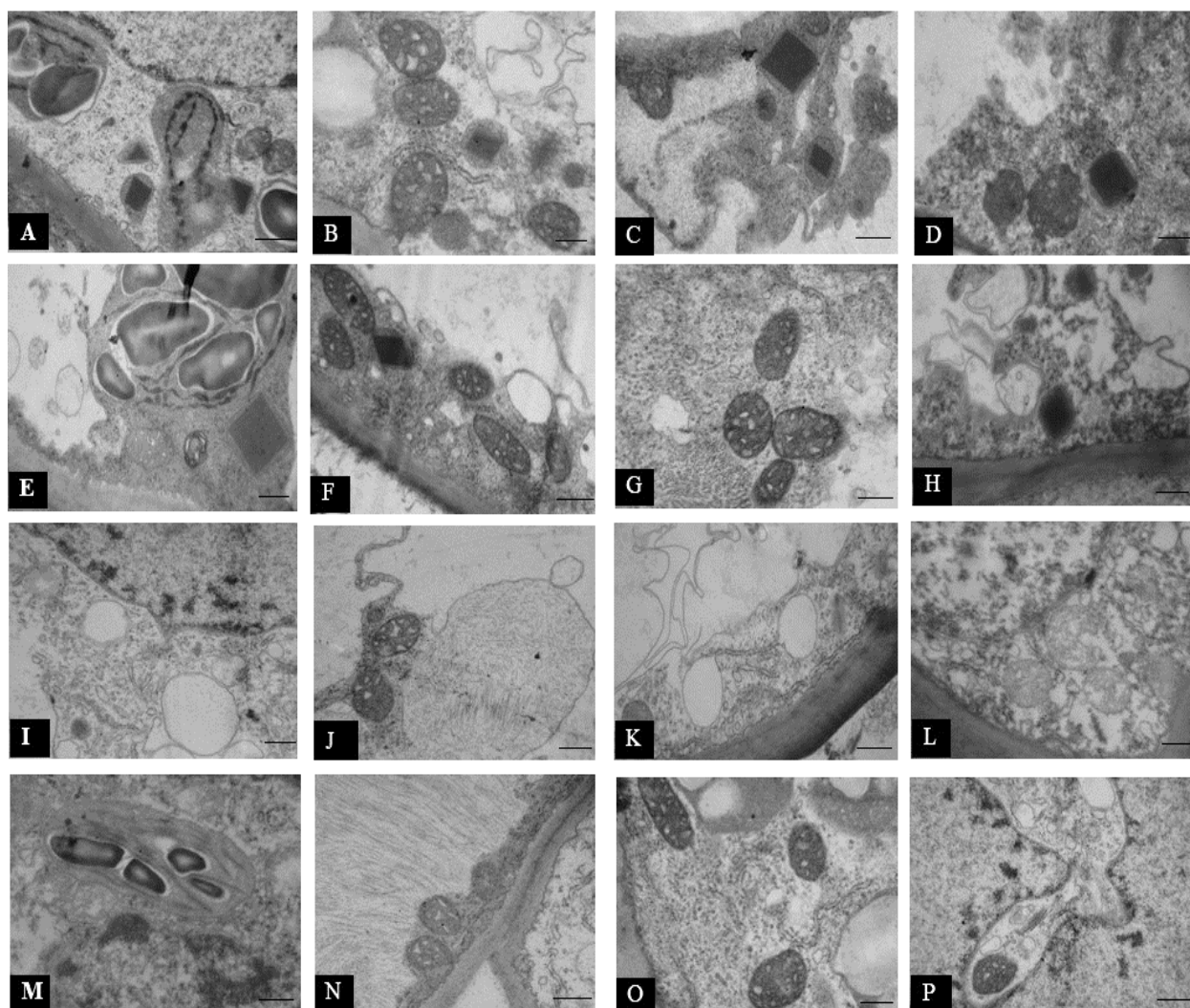


Fig. 5.1. Expresii ultrastructurale ale organelor celulelor mezofilului la infectarea cu virusuri a genotipurilor de tomate cu diferită reactivitate: s. Craigella (Tm-1/Tm-1) (A-D); s. Craigella (Tm-2²/Tm-2²) (E-H), s. Elvira (I-L), *S. pimpinellifolium* (M-P) în variantele mator (A, E, I, M) și a plantelor infectate cu VMT (B, F, J, N) și VAT (C, D, G, H, K, L, O, P) (scara barei 0,8 μm).

Aceleași tendințe au fost puse în evidență în mezofilul soiurilor Craigella (Tm-1/Tm-1) și Craigella (Tm-2²/Tm-2²) infectate cu VAT. Este de menționat, că răspunsul acestor genotipuri la infectarea cu virusul aspermiei tomatelor s-a exprimat prin sensibilitate, particulele virale fiind identificate în citoplasma țesuturilor frunzelor (Figura 5.1 C, D, G, H). Cu toate acestea, se

remarcă menținerea integrității structurale, prezența într-un număr major a mitocondriilor, peroxizomilor. Sporirea numărului de peroxizomi se consideră o reacție de apărare la factori de diferită natură cuplați cu intensificarea proceselor de detoxifiere.

Un număr semnificativ de mitocondrii comparativ cu martorul a fost descris în celulele mezofilului ale speciei *S.pimpinellifolium*, infectate cu VMT sau VAT (Figura 5.1 N, O). Totodată în hialoplasmă puteau fi vizualizate particule virale dispersate printre organite sau în acumulări în cavitatea vacuolei (Figura 5.1 N). Aparatul nuclear a prezentat aspect eucromatic, precum și invaginări semnificative ale membranei nucleare ce denotă o activare a reacțiilor de apărare în aceste sisteme patologice (Figura 5.1 P). În celulele s. Elvira caracterizat prin susceptibilitate față de VMT și VAT s-a atestat un grad accentuat 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 direct cu gradul de manifestare a simptomelor bolii. Astfel, s. Elvira la infectarea cu VAT sau VMT a prezentat mozaic clorotic cu deformări majore. Primele pete clorotice au fost semnalate la cca 10-14 zile de la inoculare cu VAT și 7-10 zile cu VMT. Soiurile Craigella (Tm-1/Tm-1) și Craigella (Tm-2²/Tm-2²) au prezentat o reacție diferită la infecția virală: de la mozaic slab la pete clorotice în varianta cu TAV. Datorită temperaturilor ridicate ale condițiilor experimentale, simptomele bolii au fost observate și în variantele cu VMT, dar cu un grad mai mic de manifestare. La varietatea *S. pimpinellifolium* simptomele exterioare nu s-au manifestat, deși prezența particulele virale a fost confirmată prin tehnica de microscopie electronică.

Pentru a menține metabolismul celular în sistemele patologice, plantele dezvoltă reacții de apărare orientate spre diminuarea efectelor cauzate de viroze, precum SRO, care se produc în cantități înalte în cazul infecțiilor incompatibile, dar și compatibile. În condiții normale, SRO produse la nivel intracelular sunt eficient metabolizate. Acest echilibru între producerea și detoxifierea SRO este susținut de factorii antioxidanți enzimatici și nonenzimatici [298; 299]. Se știe că mecanismele de apărare ale plantelor ca răspuns la agenții nocivi, inclusiv virusuri, sunt activate într-un timp foarte scurt. Complexitatea reacțiilor de răspuns impune adoptarea unor abordări integrative axate pe cuantificarea principalelor enzime implicate în menținerea statutului redox [20]. Dintre enzimele majore antrenate în reacțiile de detoxifiere și apărare un rol important îl joacă peroxidaza. Perturbarea activității POX este considerată a fi un răspuns nespecific la deteriorările mecanice, factorii abiotici și biotici [264].

Ținând cont de particularitățile procesului de patogeneză, pentru evaluarea activității peroxidazei și polifenoloxidazei, 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 martorul II - pentru cele infectate cu VMT. În sistemele patologice analizate activitatea acestor doi fermenți a prezentat dependență de sistemul genotip-patogen (Tabelul 5.1).

Tabelul 5.1. Activitatea peroxidazei și polifenoloxidazei în extractele vegetale ale genotipurilor de tomate infectate cu virusuri și descendenții acestora

Genotip	Variantă	Activitatea peroxidazei (densitatea optică, u.r.)	Activitatea polifenoloxidazei (densitatea optică, u.r.)
<i>S. pimpinellifolium</i>	Martor I	0,1279±0,0491	0,0619±0,0049
	VAT	0,0790±0,0111	0,0974±0,0125**
	Descendenți VAT	0,1434±0,0124	0,0879±0,0056**
	Martor II	0,1485±0,0408	0,1447±0,0093
	VMT	0,2734±0,1286*	0,1769±0,0322
	Descendenți VMT	0,1318±0,0205	0,1678±0,0121
s. Craigella (Tm-1/Tm-1)	Martor I	0,2732±0,1245	0,0839±0,0019
	VAT	0,1676±0,0073	0,2534±0,0577***
	Descendenți VAT	0,2044±0,068	0,1801±0,0551***
	Martor II	0,3116±0,0207	0,1890±0,0371
	VMT	0,2627±0,0287*	0,1936±0,0391
	Descendenți VMT	0,1976±0,0223**	0,1543±0,0298
s. Craigella (Tm-2 ² /Tm-2 ²)	Martor I	0,2699±0,0323	0,0656±0,0089
	VAT	0,2697±0,0775	0,2087±0,0297**
	Descendenți VAT	0,2499±0,0894	0,0733±0,0181*
	Martor II	0,2645±0,0106	0,1847±0,0068
	VMT	0,2469±0,0861	0,1822±0,0083
	Descendenți VMT	0,3307±0,0483*	0,1848±0,0302
s. Elvira	Martor I	0,1704±0,0291	0,0859±0,0139
	VAT	0,4870±0,1055**	0,0681±0,0033*
	Martor II	0,2069±0,0550	0,2241±0,0252
	VMT	0,4402±0,0745**	0,2259±0,0279
	Descendenți VMT	0,3477±0,0434**	0,2650±0,0472

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

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. Valoarea medie a activității peroxidazei la plantele infectate cu TAV, cu excepția s. Elvira, nu a prezentat

modificări confirmate statistic. Examinarea parametrilor individual per plantă scoate în evidență variabilitatea semnificativă în cadrul aceleiași variante (Figura 5.2).

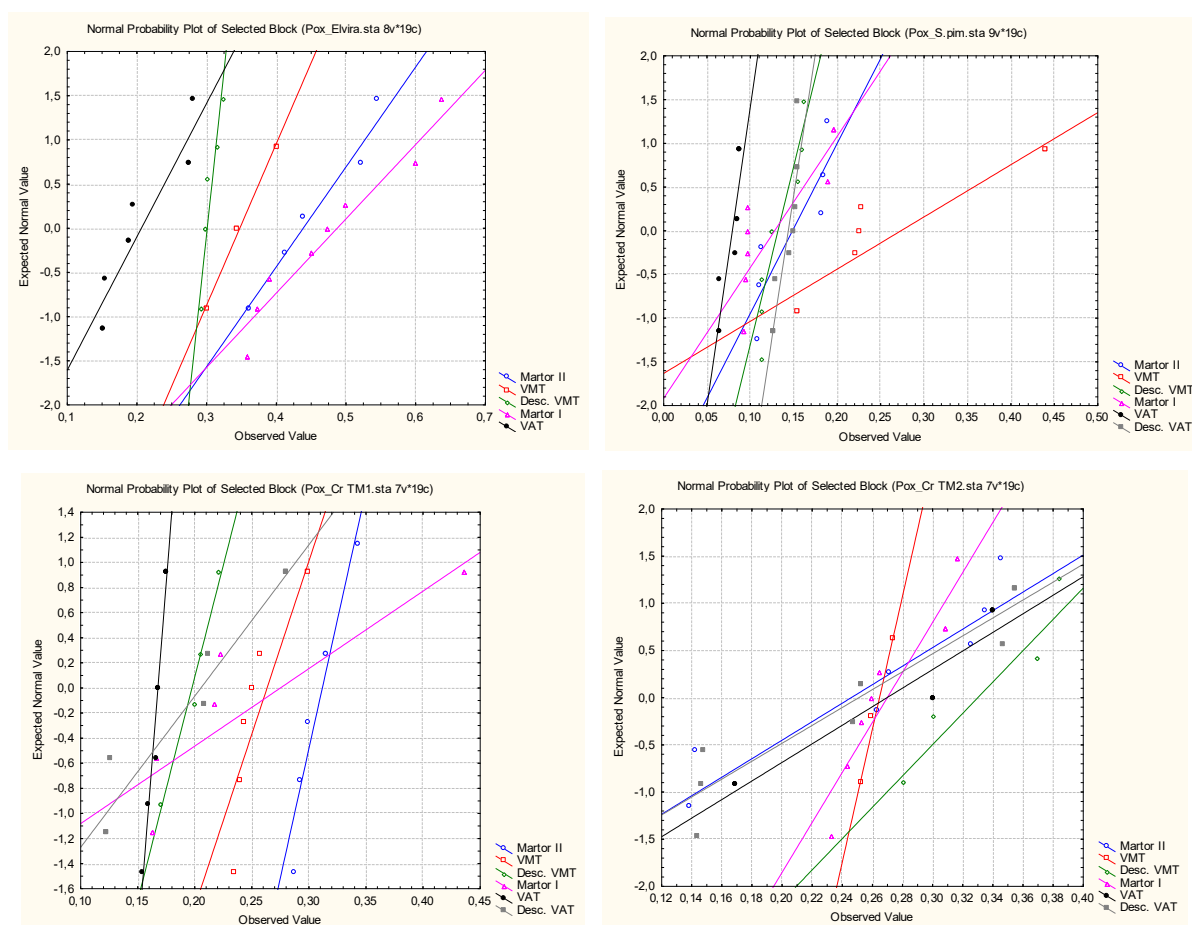


Fig. 5.2. Activitatea peroxidazei la genotipurile de tomate cu diferită reacție la infecțiile virale.

La genotipul susceptibil Elvira în cazul infecțiilor provocate de VMT sau VAT, se remarcă deplasarea distribuțiilor individuale spre valori mai mici, comparativ cu martorul. Diapazonul indicilor POX în varianta VAT a înregistrat valori orientate spre zero. Trebuie de notat, că la s. Elvira gradul de expresie a simptomelor expuse la aspermie a fost cel mai accentuat. Reducerea activității antioxidante în ambele sisteme genotip-virus descrise prin susceptibilitate a fost asociată cu distrucții majore ale structurii interne la majoritatea organelor celulare.

Valorile activității POX notificate la genotipurile cu toleranță (*S.pimpinellifolium*) și cu gene de rezistență la VMT (Craigella (Tm-1/Tm-1) și Craigella (Tm-2²/Tm-2²) au prezentat o tendință de majorare sau diminuare comparativ cu matorul în dependență de agentul patogen [51]. La soiurile cu gene de rezistență au fost atestate cele mai semnificative fluctuații în direcția activării POX.

La plantele *S. pimpinellifolium* în varianta martor activitatea peroxidazei a înscris valori între 0,11-0,19 (u.d.o., unități a densității optice), în variantele experimentale au fost înregistrate 0,16-0,44 (u.d.o.). Un nivelul sporit al POX (0,25 - 0,27) a fost stabilit de asemenea la s. Craigella (Tm-2²/Tm-2²), infectat cu VMT și descendenții acestora.

Infecția provocată de VMT a avut o influență semnificativă doar asupra activității peroxidazei, în timp ce nivelul mediu al polifenoloxidazei nu a suportat schimbări confirmate statistic la genotipurile infectate cu acest patogen, precum și la descendenții obținuți în condiții de patogeneză (Tabelul 5.1). 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 majoră creștere, de cca 3 ori s-a stabilit la genotipurile Craigella (Tm-1/Tm-1) și Craigella (Tm-2²/Tm-2²). Sporirea activității PPO a marcat, de asemenea, valori semnificative la plantele de *S. pimpinellifolium* infectată cu VAT, precum și la descendenții.

Totodată, infecțiile virale au condus la accentuarea fluctuațiilor activității PPO individual per planta în majoritatea combinațiilor gazdă-patogen, inclusiv la descendenții plantelor infectate (Figura 5.3).

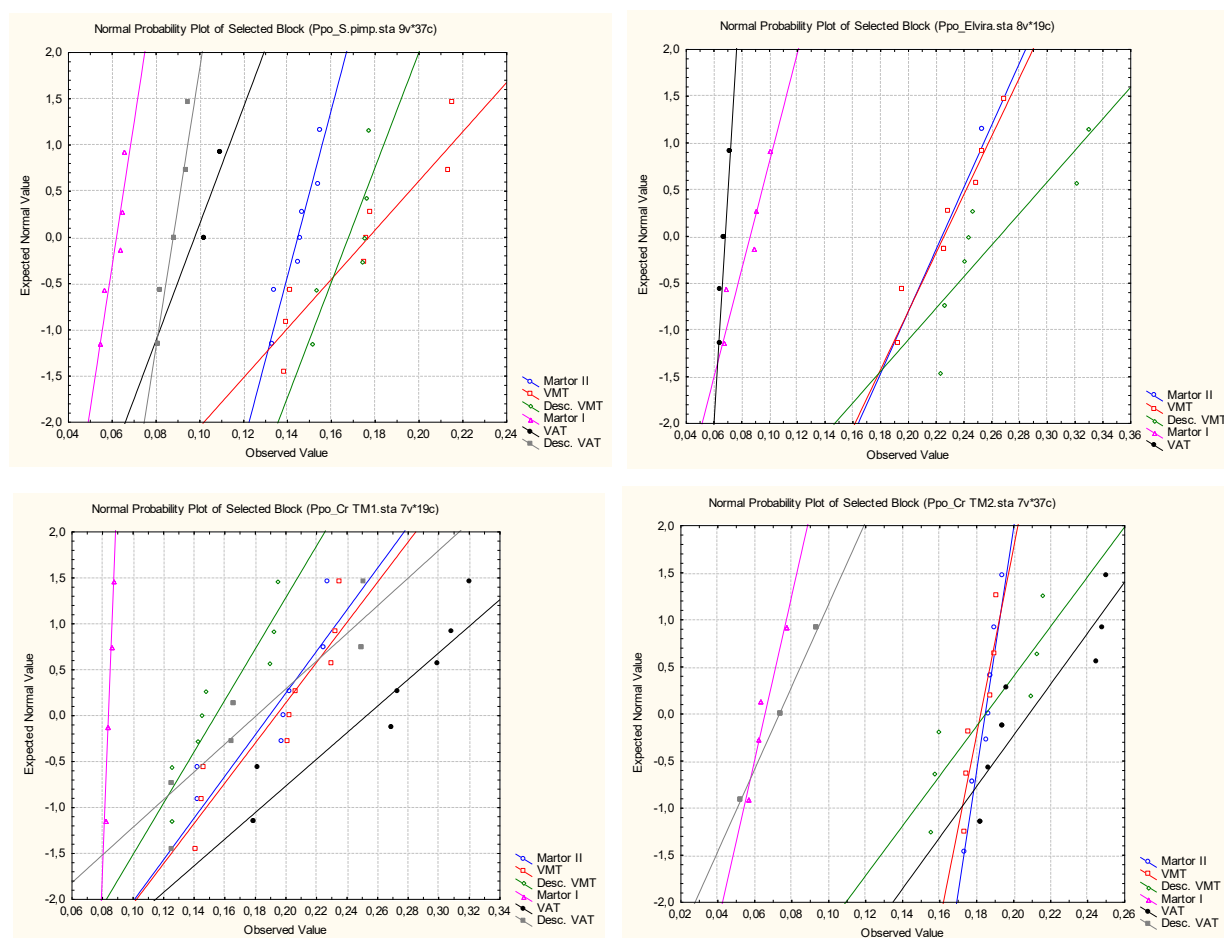


Fig. 5.3. Activitatea polifenoloxidazei la genotipurile de tomate cu diferită reacție la infecțiile virale.

Abateri mai accentuate au fost constatate la Craigella (Tm-1/Tm-1) / VAT pentru care activitatea PPO a expus valori între 0,179-0,32 (u.d.o.) comparativ cu martorul (0,082-0,087 u.d.o.), precum și la Craigella (Tm-2²/Tm-2²)/ VAT cu un diapazon al distribuției similar.

Trebuie menționat, că 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 diferitelor tipuri de lizozomi) (Figura 5.1 C, D, G, H, O, P), iar diminuarea a fost atestată în cazul genotipului ce a manifestat simptome severe, precum 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 joacă factorii non-enzimatici, cum ar fi metaboliții secundari, precum compușii fenolici, steroidalii cu rol antioxidant. Rolul compușilor fenolici în stabilirea mecanismelor de interacțiune gazdă-patogen este demonstrat pe exemplul florii soarelui și parazitului *Orobancha cumana*, efect explicat prin stimularea procesului de lignificare și dezvoltare a barierelor mecanice [128].

Conform Spencer J. și coaut. [390] capacitatea antioxidantă din extractul de tomate corelează cu conținutul de metaboliți secundari. În acest scop, prezintă interes evaluarea histologică a localizării α -tomatinei, un alkaloid implicat în formarea răspunsului plantelor la stresul biotic, inclusiv virusuri [385]. Conform studiului histologic al secțiunilor pețiolilor s.Elvira, speciei *S. pimpinellifolium*, soiurilor Craigella (Tm-1/Tm-1) și Craigella (Tm-2²/Tm-2²) infectate cu VMT sau VAT, au fost certificate deosebiri în localizarea și gradul de acumulare a granulelor de α -tomatină (Figura 5.4). Acumulări semnificative de alkaloid au putut fi vizualizate în celulele parenchimale ale sp. *S. pimpinellifolium* infectate cu VAT sau VMT (Figura 5.4 B, C). Evaluările structurii pețiolilor au demonstrat că granulele de alkaloid sunt localizate în floem, precum și în parenchimul xilemului [286]. De asemenea, concentrări abundente de α -tomatină s-a stabilit în pețiolii soiurilor deținătoare de gene de rezistență în condiții de patogeneză virală (Figura 5.4 I-J, L-M).

Conform relatărilor din literatură compușii alcaloizi se pot acumula în celulele epidermale și parenchimale [211]. În cercetările noastre, granulele au fost identificate și în trihomii glandulari, care se consideră a fi "fabrici chimice" redenumiți grație activității prolife în sintetiza și stocarea metaboliților cu funcții de apărare [90].

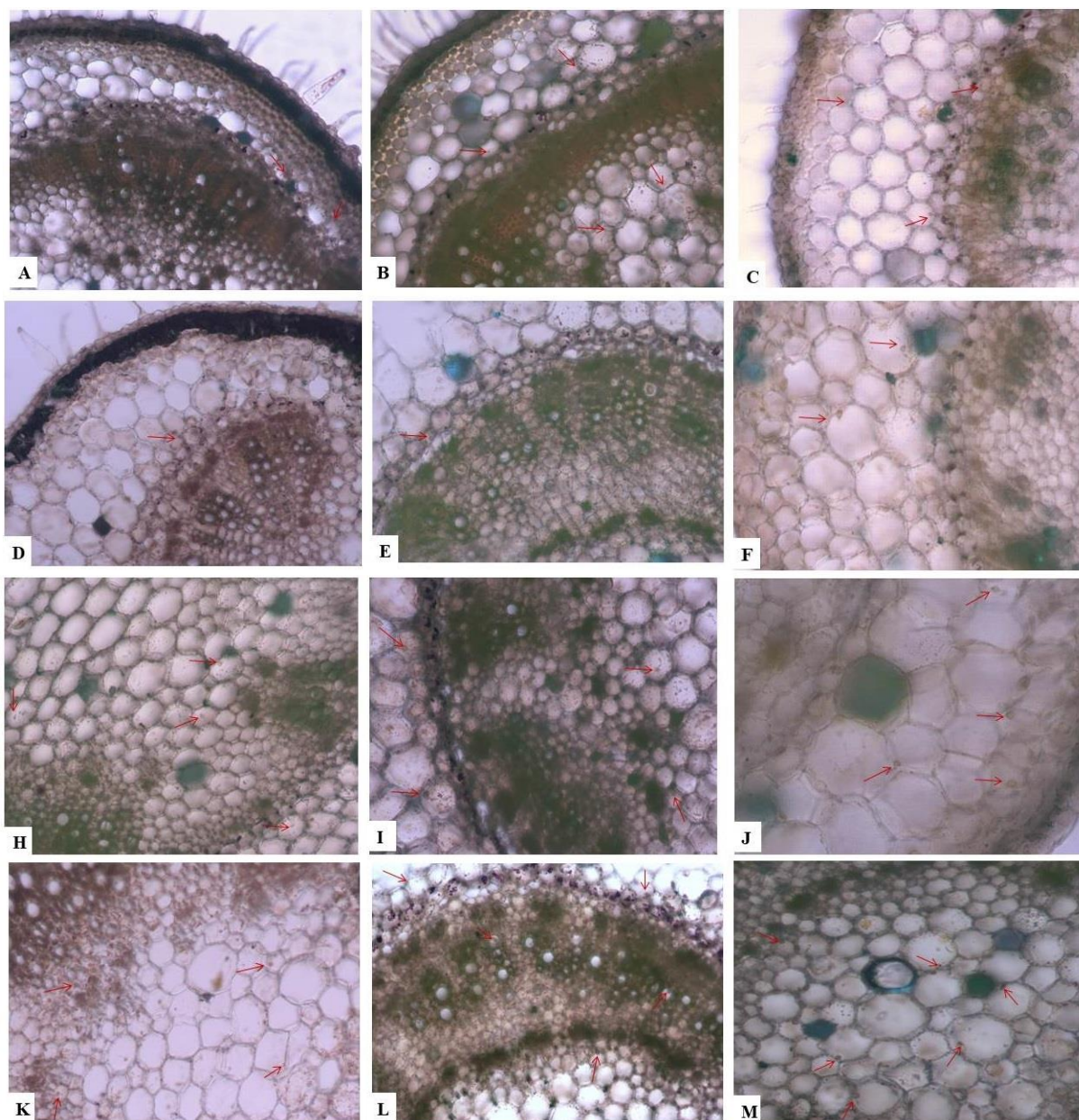


Fig. 5.4. Localizarea histochimică a α -tomatinei în țesuturile pețiolilor plantelor de tomate sănătoase (A, D, H, K) și infectate cu VAT (B, E, I, L) sau VMT (C, F, J, M). Secțiuni transversale la genotipurile: A-C – *S. pimpinellifolium*, D-F – s. Elvira, H-J – s. Craigella (Tm-1/Tm-1), K-M – s. Craigella (Tm-2²/Tm-2²) (x 150).

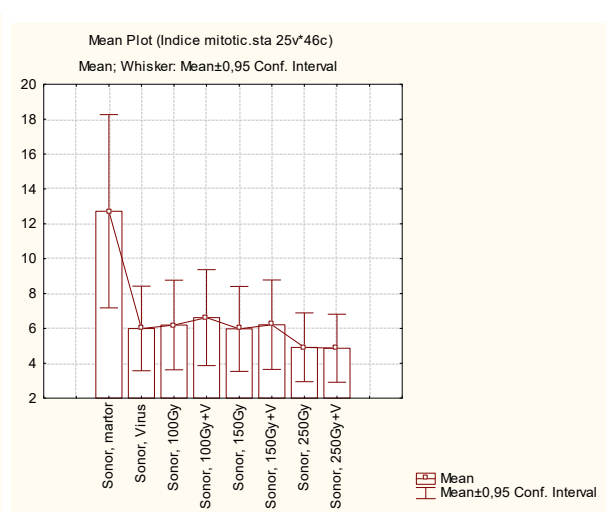
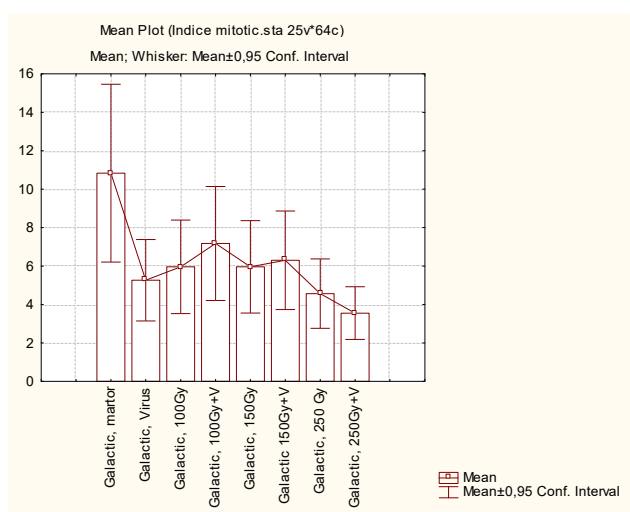
Tomatina este un glicoalcaloid steroidal descris în tomate și alte specii *Solanaceae*. Glicoalcaloizii sunt metaboliți care protejează plantele împotriva insectelor, fungilor, bacteriilor, inclusiv a virusurilor [385]. A fost constatată acumularea α -tomatinei în tomatele rezistente la agentul patogen al ofilirii vasculare precum *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, în special în tulpini și rădăcini la trei zile după inocularea soiurilor rezistente și susceptibile [145], însă autorul nu prezintă o explicație clară a acestui fenomen. În sistemele patologice evaluate de noi se remarcă acumulări majore de α -tomatină în celulele pețiolilor genotipurilor de tomatelor tolerante sau deținătoare de gene de rezistență.

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

Estimarea particularităților proliferării celulelor vegetale, inclusiv a celor meristematice, cuprinde multiple aspecte privitor la reactivitatea plantelor față de diverși factori, ținând cont de particularitatea de a reacționa rapid și activ la factorii endo- și exogeni [460]. Conservatismul proceselor proliferative asigură posibilitatea utilizării diferiților parametri ai diviziunilor mitotice în studiile de monitoring.

În cercetările citogenetice ale mitozei cu succes se utilizează mai mulți parametri, inclusiv indicele mitotic și frecvența micronucleilor [282]. Indicele mitotic reflectă reacția genotipului la acțiunea diferiților factori, care reprezintă mecanismul de adaptare a organismului exprimat la nivel celular, orientat spre menținerea homeostaziei în sistemele celulare. Indicele mitotic constituie un criteriu important utilizat în aprecierea proceselor de proliferare [469].

Conform rezultatelor studiului citologic, valoarea indicelui mitotic a constituit 10,44; 12,39 și 12,7% pentru soiurile Galactic, Sonor și Unirea, respectiv. Materialul semincer obținut de la plante infectate cu virus și/sau iradiate a prezentat valori sub media estimată în varianta martor (Figura 5.5). O reducere majoră a valorii indicelui mitotic la s. Galactic a fost constatată pentru lotul cu aplicare asociată a VMDO și razelor gama în doza de 250Gy (o micșorare cu 69% față de martor). O scădere similară a valorii indicelui mitotic a fost remarcată și în varianta cu utilizare doar a razelor gama în aceeași doză (250 Gy). Impactul cauzat de razele gama în doza de 100 Gy, precum și 150 Gy a fost mai lejer decât în cazul plantelor infectate cu virus (diferențe între variantele experimentale statistic confirmate pentru $P \leq 0,05$).



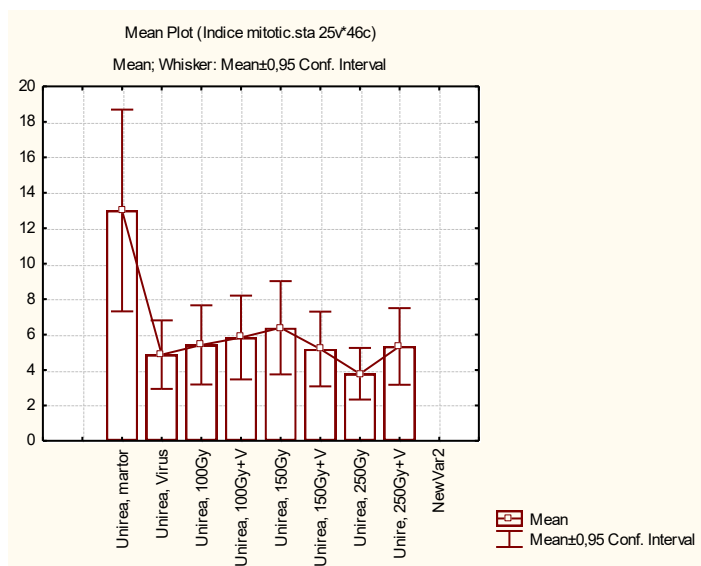


Fig. 5.5. Indicele mitotic (%) în radiculele de orz ale semințelor obținute de la plante infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului și/sau iradiate cu raze gama.

Tabloul constatat la celelalte două soiuri – Sonor și Unirea, a prezentat tendințe similare în modificarea indicelui mitotic. La s. Sonor infecția virală a cauzat reducerea numărului celulelor mitotice cu o valoare apropiată celei induse de razele gama în doza 100 Gy sau 150 Gy. La iradierea semințelor cu raze gama în doza de 250 Gy indicele mitotic a scăzut cu cca 62%, prezentând practic un nivel similar lotului cu acțiune combinată (63%). În cazul soiului Unirea, VMDO a contribuit la majorarea efectului depresiv al razelor gama în doza de 150 Gy și reducerea impactului radiației în doza de 250 Gy (în ambele cazuri diferențele între variantele experimentale au fost statistic confirmate pentru $P \leq 0,05$) [12].

În literatura de specialitate sunt prezentate multiple date privitor la inhibarea mitozei la plantele de cultură, inclusiv orz, sub acțiunea diferiților factori, preponderent chimici. Astfel, este descrisă reducerea valorii indicelui mitotic la orz ca rezultat al acțiunii dioxidului de sulf [434], compușilor oxigenați [363], unor insecticide și fungicide în diverse concentrații [386].

Se consideră, că fluctuațiile indicelui mitotic reflectă direct intensitatea reacțiilor metabolice, iar ritmul modificării este dependent de viteza reacțiilor fermentative [454]. Diminuarea valorii indicelui mitotic sub acțiunea diferiților factori denotă caracterul mitodepresiv al acestora, generat de reprimarea diviziunilor celulare [334]. Hidalgo A. și coaut. [185] explică efectul antimitotic al erbicidelor (profan și clorprofan) la sp. *Allium cepa* prin inhibarea activității enzimelor, inclusiv a ADN-polimerazei. Reducerea indicelui mitotic poate avea loc ca rezultat al inhibării sintezei ADN în faza S [394], blocării celulelor în G_1 [368] sau reținerii celulelor în G_2 [134]. Conform Yi H. și coaut. [434], declinul proceselor proliferative în radiculele de orz sub influența dioxidului de sulf poate fi generat și de degradări ale ADN-ului.

Se consideră că impactul asupra mitozelor este major în cazul acțiunii factorilor mitodepresivi pe parcursul perioadei S a ciclului celular [386].

Diminuarea valorilor indicelui mitotic în variantele experimentale au fost complementate de creșterea frecvenței micronucleilor (Tabelul 5.2).

Tabelul 5.2. Frecvența micronucleilor în radiculele de orz în cazul infectării cu virusul mozaicului dungat al orzului pe fondalul razelor gama

	Variantă	Interfaze analizate (număr)	Frecvența micronucleilor	C-metafaze (%)
s. Galactic	Martor	1683	0,233±0,037	-
	Virus	1405	0,633±0,059***	1,42
	100Gy	1800	0,390±0,010***	-
	100Gy + virus	1830	0,363±0,025**	-
	150Gy	1890	0,863±0,163***	-
	150Gy + virus	1795	0,983±0,194***	1,11
	250Gy	2405	1,167±0,050***	0,42
	250Gy + virus	2069	1,223±0,133***	1,93
s. Sonor	Martor	2039	0,140±0,131	-
	Virus	2737	0,620±0,115**	0,37
	100Gy	2345	0,477±0,124*	-
	100Gy + virus	2263	0,510±0,098**	-
	150Gy	2657	0,687±0,154**	-
	150Gy + virus	2340	0,793±0,191**	0,43
	250Gy	2683	0,933±0,146***	-
	250Gy + virus	2014	1,136±0,125***	0,99
s. Unirea	Martor	1482	0,267±0,083	-
	Virus	1661	0,727±0,032***	0,60
	100Gy	1972	0,356±0,006*	-
	100Gy + virus	1895	0,573±0,210*	-
	150Gy	1724	0,700±0,069***	-
	150Gy + virus	1966	0,853±0,071***	-
	250Gy	2383	1,143±0,222***	0,42
	250Gy + virus	1980	1,433±0,132***	1,52

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

Micronucleii reprezintă corpi cromatinici extranucleari rezultați în urma rupturilor cromozomale sau ai aneuploidiei [282], fiind considerați indici relevanți ai instabilității genomului [465].

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 5.6). Este important de menționat, că la toate cele trei soiuri de orz analizate infecția virală separată 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 250Gy a fost, practic, la nivelul cauzat doar de radiație.

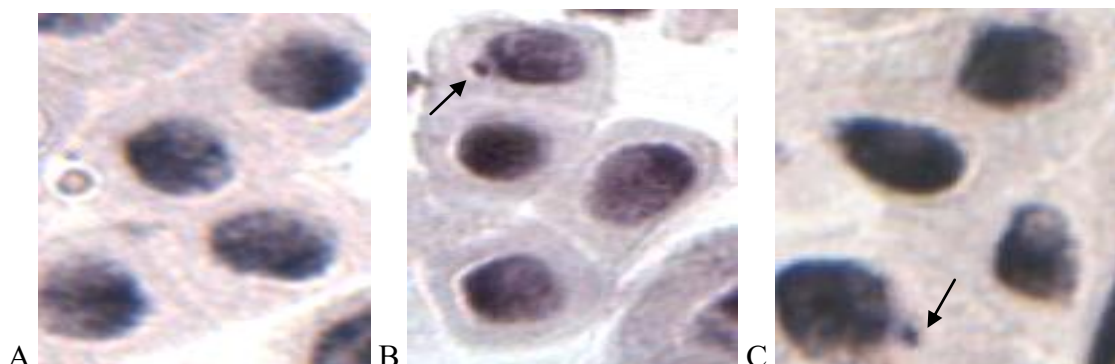


Fig. 5.6. Celule interfazice în meristemele radiculare de orz: A) interfaze normale în varianta martor; B) interfază cu micronucleu (indicat prin săgeată) în rădăcioarele plantelor de orz, s. Galactic infectat cu VMDO; C) micronucleu (indicat prin săgeată) în celulele meristemei radiculare la s. Galactic iradiat cu raze gama 150 Gy și infectat cu VMDO (x 400).

Anomaliile de tipul C-mitozelor se consideră un rezultat al restructurărilor fusului de diviziune [134]. De asemenea, C-mitozele pot fi cauzate de dublarea numărului de cromozomi. În lipsa citochinezei acestea conduc la formarea celulelor poliploide sau bi(poli)nucleate. În cazul formării fragmoplastului și a peretelui celular, pot apărea celule cu număr diferit de cromozomi [247, p.342]. Posibilitatea inducerii aneuploizilor la grâu și orz sub acțiunea VMDO, a fost menționată încă de autorii Linde-Laursen I., Siddiqui K. [261]. Conform studiilor citologice ale diviziunilor mitotice particulele VMDO au fost constatate în nemijlocita apropiere a microtubulilor, ceea ce relevă impactul direct al virusului asupra elementelor fusului de diviziune.

Este important de menționat, că în variantele ce reprezentau plantele infectate cu VMDO s-a constatat apariția C-metafazelor (Tabelul 5.2, Figura 5.7). La soiurile Galactic și Sonor au

fost atestate C-metafaze și în loturile cu aplicare complexă a infecției virale și razelor gama în dozele de 150 Gy și 250 Gy, iar la soiul Unirea – doar în comun cu radiația în doza de 250 Gy.

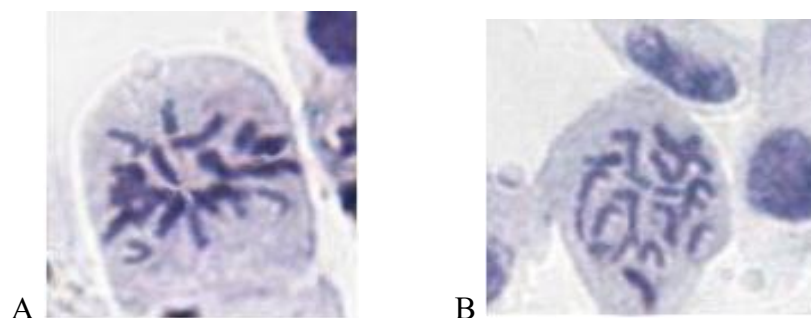


Fig. 5.7. C-metafaze în radiculele de orz, soiul Unirea: A) infectat cu virusul mozaicului dungat al orzului; B) iradiat cu raze gama (150 Gy) și infectat cu virusul mozaicului dungat al orzului (x 600).

Datele examenului citogenetic al diviziunilor mitotice privitor la inducerea de degradări ale ADN-ului au fost confirmate prin estimarea mutațiilor clorofilene (Figura 5.8).

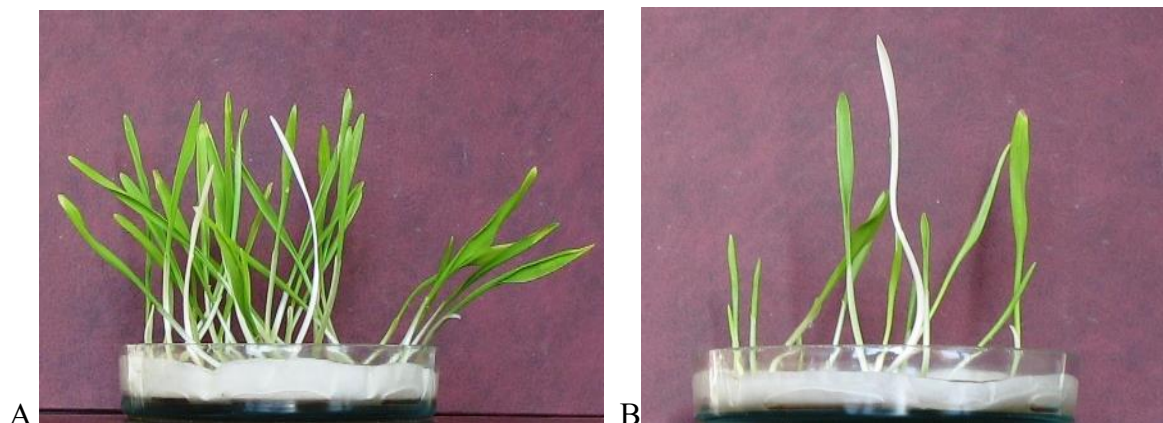


Fig. 5.8. Mutații clorofilene la plantulele s. Unirea A) infecție virală; B) infecție virală în complex cu raze gama 150 Gy.

De menționat, că plantule albinoase nu au fost constatate în toate variantele experimentale. Asemenea mutații, exprimate prin lipsa pigmentilor clorofilieni, au fost vizualizate preponderent la s. Unirea în lotul derivat din plante infectate cu virus, separat sau în complex cu raze gama în doza de 150 Gy.

Posibilitatea inducerii mutațiilor clorofilene la orz, este descrisă pentru diverși factori și condiții de aplicare a acestora [456; 482]. În cazul utilizării izotopului radioactiv Co^{60} în comun cu etilenamina, Питиримова М. [482] constată apariția de plantule albinoase. Conform autoarei, mutațiile clorofilene au fost constatate în cazul unui synergism maximal ($k=3$) stabilit între concentrația substanței (0,05%) și doza radiației (49,5Gy). Аветисова В.А., Валева С.А. [444] au remarcat, că rata mutațiilor clorofilene la orz depinde de doza radiației, concentrația mutagenului și consecutivitatea aplicării acestora. Un nivel înalt de mutații clorofilene a fost

stabilit în varianta obținută din semințe iradiate cu doze mici de raze γ (1kR) și tratate cu compuși mutageni (în așa concentrații mici, ca 0,02; 0,04%). Utilizarea substanței anterior radiației, sau razelor γ în doză mare (10 kR) induce un efect mai lejer. Autorii presupun că în acest caz, celulele cu aberații sunt eliminate mai intens.

Impactul radiației asupra materialului genetic este bine cunoscut. Rogakou E. și coaut. [355] explică geneza rupturilor dublu catenare, produse în urma radiației, drept rezultat al fosforilării histonei H₂A la nivelul serinei, cu toate că nu exclud posibilitatea existenței și altor centre ale cromatinei sensibile la acest factor. La iradierea cu raze gama a celulelor stem se produc defecte pentru gena proteinkinazei Cdk₁ ce conduc la dereglări ale punctelor de restricție ce asigură tranziția G₂/M [266].

În rezultatul studiului realizat putem concluziona, că virusul mozaicului dungat al orzului separat, precum și în complex cu razele gama cauzează deranjamente ale procesului mitotic care induc inhibarea proliferării celulare. Inhibarea diviziunilor celulare este suplimentată de așa patologii mitotice cum sunt micronucleii și C-metafazele. Consecințele induse de razele gama au prezentat o complexitate sinuzală specifică genotipului analizat. Un efect neliniar similar a fost constatat și de către Geraskin S. și coaut. [153] la tratarea semințelor de orz cu raze gama în doze mici (10–1,000 mGy).

S-a stabilit, că virusul mozaicului dungat al orzului provoacă efecte 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. Studiul citologic al diviziunilor mitotice în radiculele de orz în cazul infecției virale denotă efectul mitodepresiv al infecției virale și genotoxicitatea virusului mozaicului dungat al orzului.

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

Schimbările între cromatidele surori, SCS (sister chromatid exchange, SCE), au fost pentru prima dată descrise la plante de către Kihlman B. și Kronborg D. [231] prin aplicarea tehnicii de colorare Giemsa. Conform mai multor cercetători, SCS se datorează rupturilor dublu catenare nereparate la momentul replicării ADN, opinie enunțată încă de către Wolff S. și coaut. [425]. De asemenea, SCS pot fi induse și de abateri în procesul de reparare a acestor rupturi

[209; 321]. Se consideră, că geneza SCS este condiționată de procesele de replicare a ADN, și anume de formare a furcilor replicative, momente în care poate avea loc recombinația cromatidelor surori [224]. Conform modelului replicativ de formare a SCS, propus de Painter R. [330], replicarea și repararea rupturilor dublu catenare, produse la hotarele a două clustere de repliconi, decurg asincron. O asemenea situație poate fi generată de viteza diferită a procesului de replicare, precum și de modificările structurale în molecula de ADN. Studiul SCS la sp. *Saccharomyces cerevisiae* a pus în evidență trei mecanisme implicate în livrarea schimburilor cromatidice: inducerea de rupturi duble în catena de ADN, degradări ale procesului de replicare și a celor legate de activitatea ADN-polimerazei [122]. În celulele expuse influenței razelor ultraviolete, razelor X, 4-nitroquinolin 1-oxidului, metilmetanfulfonatului se constată activarea genelor RAD55, RAD57 și RAD54, implicate în repararea rupturilor ADN, ceea ce nu are loc în condiții spontane, contrar faptului, că și în condiții normale sunt induse un oarecare procent de schimburi cromatidice. Autorii concluzionează, că mecanismele de formare a SCS immanente și celor induse diferă.

Cu toate că mecanismul formării SCE este încă discutabil [424], cert este stabilit, că geneza acestor schimburi este asociată de leziunile ADN-ului. Grație conservatismului proceselor ce stau la baza formării SCS, testul dat este utilizat pe larg în estimarea genotoxicității [282; 336], fiind aplicat în evaluarea efectului mutagen al diferiților compuși atât la plante [230; 256; 344; 362; 434; 435], cât și la animale [74; 209; 472].

Conform cercetărilor realizate de către Zhang Z., Yang J. [441], în inducerea SCS la plante (*Vicia faba*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*), limfocitii umani și celulele splinei la șoricei, sub acțiunea unui spectru vast de compuși chimici (etanol, oxid de crom, benzosulfamid de sodiu, fluorouracil, acid ascorbic) au fost constatate tendințe similare ale efectelor stabilite, indiferent de obiectul studiat. După autori, tehnica de evidență a SCS la plante este mult mai simplă și se recomandă pentru utilizare în aprecierea genotoxicității diferitelor substanțe.

În opinia mai multor autori, fitovirusurile pot induce diverse efecte genetice [77; 93; 301; 437], inclusiv modificarea ratei schimburilor între cromatidele surori [11; 478]. Astfel, în baza analizei SCS a fost confirmată însușirea mutagenă a virusului piticirii rugoase a porumbului la unele forme de porumb sensibile față de acest patogen [478]. Utilizarea testului dat ne-a permis, de asemenea, să constatăm efectul mutagen al virusului mozaicului comun al fasolei la bob în dependență de etapele procesului de patogeneză virală. În cazul virozei naturale declanșate la etape ontogenetice mai tardive acest efect nu a fost confirmat statistic.

Pentru aprecierea efectului clastogen al infecțiilor virale ne-am propus drept scop evidența ratei și distribuției SCS la orz, în cazul infectării cu VMDO comparativ cu razele gama.

Analiza schimburilor între cromatidele surori la cele trei soiuri de orz de primăvară (Sonor, Unirea și Galactic) a permis stabilirea numărului de SCS raportat la o celulă sau cromozom în cazul infectării cu VMDO, radiațiilor gama (în dozele 100, 150 sau 250 Gy), precum și în cazul infectării plantelor reproduse din semințe iradiate. În baza aplicării testului SCS a fost constatat, că în condiții normale în mediu se produc 5,6 – 6,1 schimburi cromatidice surori per celulă. Atât radiația, cât și infecția virală au cauzat creșterea frecvenței SCS (Tabelul 5.3). 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 doza aplicată la tratarea semințelor, precum și genotipul analizat. Astfel, rata SCS în cazul radiației în doza de 100 Gy a sporit 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 doza de 150 Gy au indus un efect mai depresiv, decât cel cauzat de doza 100 Gy, doar la s. Galactic. La s. Unirea rata SCS per celulă a variat în jur de 7,2, având tendința 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 doza razelor gama.

Tabelul 5.3. Frecvența schimburilor între cromatidele surori induse de virusul mozaicului dungat al orzului în celulele meristemale ale radiculelor la plantele de orz sănătoase și iradiate (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 față de martor pentru $P \leq 0,05$; 0,001, respectiv.

La s. Sonor derivat din semințe iradiate cu doza 100 Gy, virusul mozaicului dungat al orzului a generat o creștere mai semnificativă a SCS față de martor, varianta infectată sau cea

iradiată. Rata SCS induse de infecția virală la s. Sonor iradiat cu doza 150 Gy a avut o valoare proximă față de cea deținută de varianta doar infectată. Aceeași tendință de reducere a frecvenței SCS a fost atestată și pentru s. Unirea însă pentru varianta „virus + 250 Gy”. La s. Galactic, VMDO, comparativ cu radiația, a condus la creșterea ratei SCS. Analiza SCS cu privire la distribuția schimburilor per cromozom a permis evidențierea tendinței de majorare a varianței în cazul variantelor experimentale ($P \leq 0,5$) (Figura 5.9).

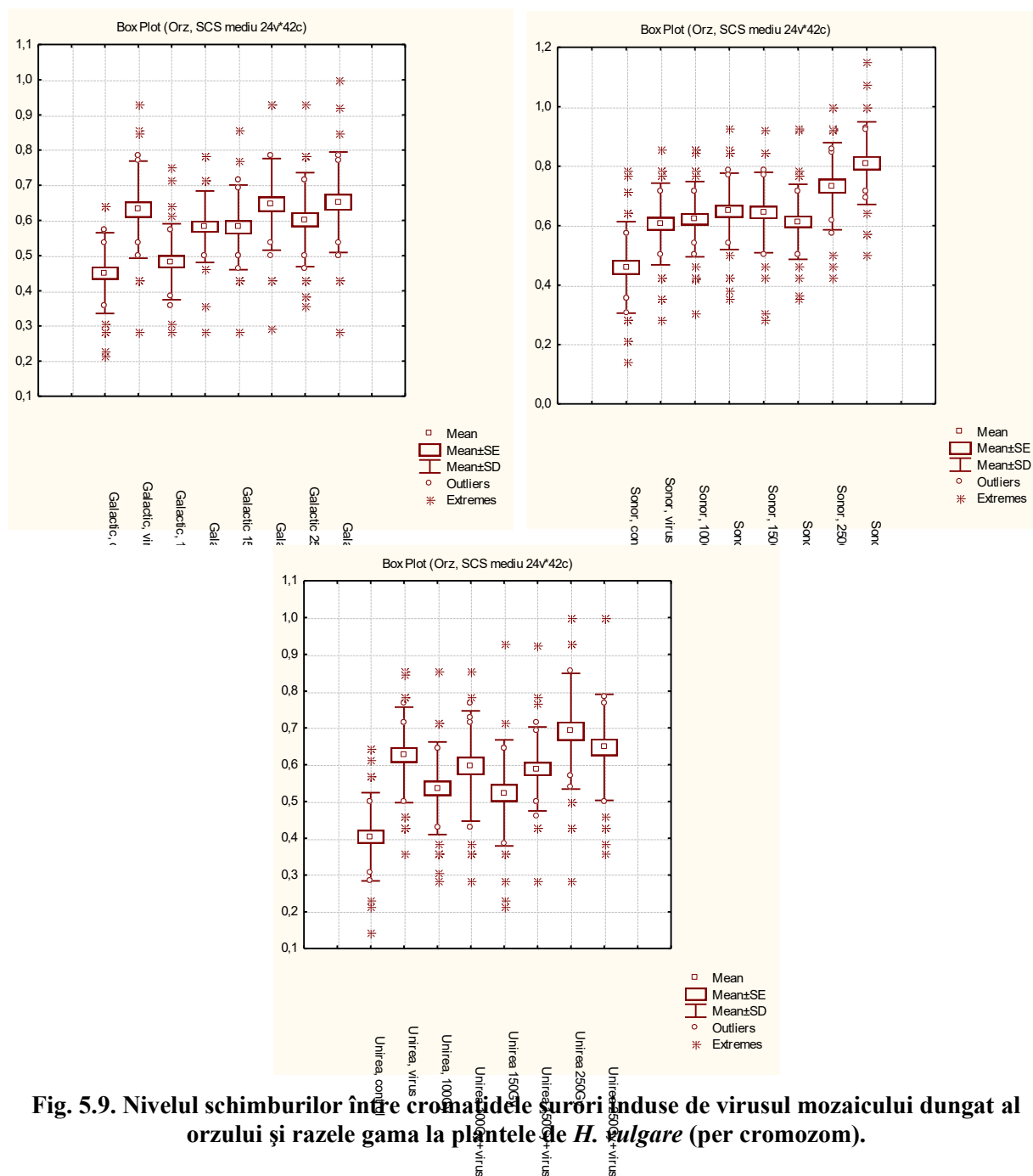


Fig. 5.9. Nivelul schimburilor între cromatidele surori induse de virusul mozaicului dungat al orzului și razele gama la plantele de *H. vulgare* (per cromozom).

Luând în considerare spectrul schimburilor între cromatidele surori, a fost constatat, că numărul și tipul SCS sunt influențate de către ambii factorii analizați [46]. 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 s. Galactic și s. Sonor iradiate cu raze gama în doza de 250 Gy).

Studiul distribuției SCS a scos în evidență tendința de majorare a ratei cromozomilor cu trei și mai multe schimburi în deosebi la variantele cu utilizare a infecției virale separat sau în asociere cu razele gama (Figura 5.10).

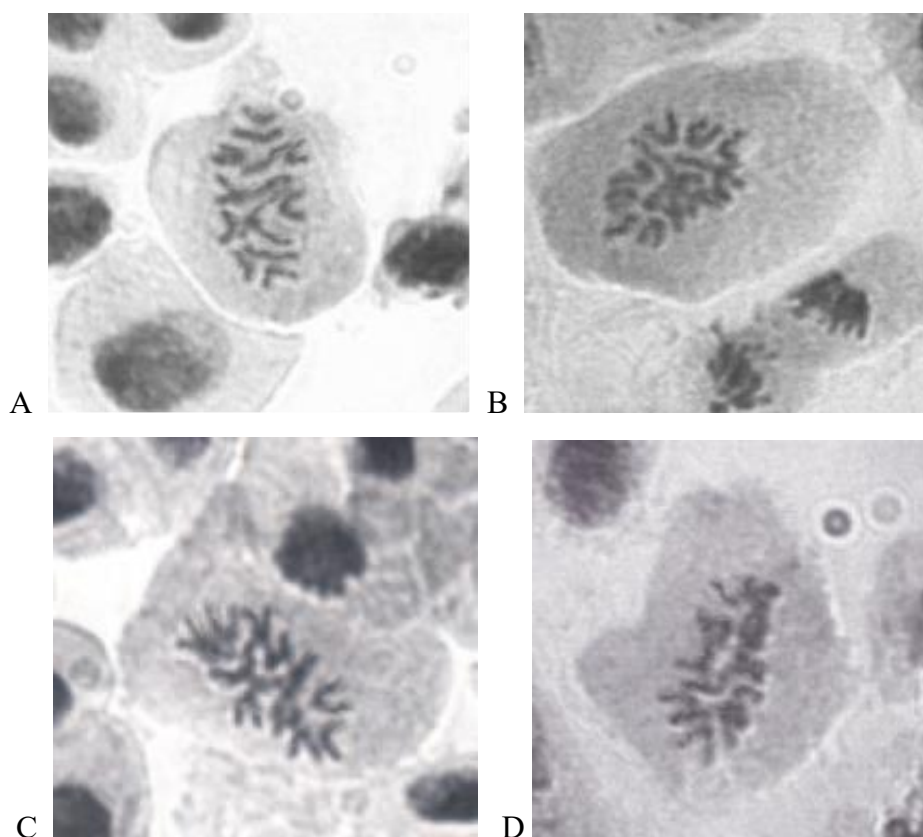


Fig. 5.10. Aspectul unor plăci metafazice în celule meristemelor radiculare la *H. vulgare*, soiul Unirea: A) martor, B) virusul mozaicului dungat al orzului, C) 150 Gy, D) 150 Gy + virus.

Majorarea frecvenței medii a SCS în cazul infecției virale, precum și a radiației se produce preponderent pe contul schimburilor multiple, rata cărora în condiții normale este redusă (0,28-0,48 per celulă). În variantele experimentale, procentul schimburilor multiple 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 constatată o creștere a cotei cromozomilor cu schimburi multiple de 12,7 ori mai mare față de martor.

Aplicarea testului ANOVA a permis de a stabili, că VMDO, similar razelor gama induce majorarea frecvenței schimburilor între cromatidele surori, efectul acestuia în funcție de genotipul plantei constituind 3,6%, virus – 6,1% și doza radiației – 13,4% (Tabelul 5.4). În ansamblu, puterea de influență a radiației pe fondal de infecție virală poate fi majorată sau diminuată în dependență de genotip și doza aplicată. Cea mai înaltă pondere în sursa de variație a fost stabilită pentru radiația gama în dependență de doză (13,4%).

Tabelul 5.4. Analiza varianței frecvenței schimburilor între cromatidele surori la plantele de orz sănătoase și infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului

Sursa de variație	Contribuția sursei de variație, %	Grad de libertate	Suma pătratelor	S ²	Testul F	P
A: Virus	6,06	1	1,3767	1,3767	71,24	0,0000
B: Genotip	3,65	2	0,8296	0,4148	21,47	0,0000
C: Doza radiației	13,42	3	3,0491	1,0164	52,50	0,0000
Interacțiunea AB	0,3	2	0,0832	0,0416	2,38	0,0930
Interacțiune AC	3,95	3	0,8985	0,2995	17,15	0,0000
Interacțiune BC	3,01	6	0,6849	0,1141	6,53	0,0000
Interacțiune ABC	1,35	6	0,3059	0,0509	2,92	0,0080
Total		913	22,7279			

Studiile citogenetice, ne permit a constata că VMDO similar razelor gama induce modificări semnificative ale numărului SCS [45]. Pentru razele gama, influența cărora asupra ADN-ului este bine cunoscută, este descrisă capacitatea de inducere a schimburilor între cromatidele surori, dependentă de doză [74], fapt confirmat și în cercetările noastre anterioare. Posibilitatea majorării SCS în condițiile patogenezei virale indică asupra efectului genotoxic cauzat de VMDO. În literatură, date cu referire la genotoxicitatea infecțiilor virale sunt prezentate pentru unele virusuri animale, cum ar fi virusul hepatitei B sau C [408].

Concluzia privitor la genotoxicitatea VMDO derivă din datele despre creșterea numărului schimburilor între cromatidele surori realizată, în majoritatea cazurilor în baza schimburilor multiple.

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

Infecțiile virale induc la gazdele susceptibile o varietate de reacții de răspuns, ce cuprind modificări structurale, fiziologice și genetice. Răspunsurile plantelor la infecțiile virale sunt legate de acumularea speciilor reactive de oxigen (SRO) [180], care joacă un rol dublu prin (i) determinarea restricției patogenului, în unele cazuri cu inducerea morții programate a celulelor la locurile de infecție și (ii) ca semnal al răspunsurilor de apărare legate de sporirea activității antioxidative în celulele adiacente. Aceste reacții ale gazdei determină un dezechilibru al metabolismului celular și al patogenului. SRO pot fi neutralizate de sistemul defensiv antioxidant celular constituit din enzime cum ar fi superoxid dismutazele (SOD), ascorbat peroxidazele (APX), catalazele, glutatation peroxidazele, și de numeroase substanțe antioxidante nonenzimatice, de exemplu vitaminele C și E, flavonoizii, ubichinona [88].

Primele enzime antrenate în detoxifierea SRO includ superoxid dismutazele, asigurând dismutarea superoxidului în oxigen și peroxid de hidrogen. Sistema majoră de neutralizare a peroxidului de hidrogen antrenează enzima ascorbat peroxidaza (APX) care catalizează conversia H_2O_2 în H_2O și O_2 .

Activitatea transcripțională a unor gene asociate metabolismului antioxidant și de patogeneza la plantele de orz infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului. Prin tehnica RT-PCR a fost evaluată în expresia unor gene implicate în metabolismul antioxidant (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 patogeneza virală cauzată de VMDO [48].

Conform rezultatelor obținute activitatea genelor APX și SOD la plantele virozate a fost diminuată față de martor (Tabelul 5.5).

Nivelul de variabilitate al modificărilor a purtat caracter specific genotipului. Cea mai semnificativă 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.

Potrivit lui Clarke S. și coaut. [97], activitatea enzimelor sistemului antioxidant pentru combinațiile virus-plantă este influențată de tipul reacției gazdei. Lipsa unor abateri pentru concentrația relativă a transcripturilor genei SOD este raportată la tutunul infectat cu VMT [235].

Tabelul 5.5. Activitatea transcripțională (unități convenționale) a unor gene a metabolismului antioxidant și defensiv în frunzulițele plantelor de orz sănătoase și infectate cu VMDO

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

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

Plantele sensibile răspund la infecțiile virale prin activarea unor gene, inclusiv a celor ce determină proteinele asociate cu patogeneza (PR) [476]. Inițial se considera că proteinele PR se sintetizează la plantele ce prezintă reacții de hipersensibilitate la virusuri. După mai multe cercetări, s-a stabilit că proteinele PR au fost identificate în plantele de tutun infectate sistemic cu VMT [143]. Ulterior, date similare au fost raportate pentru alte gazde care au prezentat sensibilitate la alte virusuri [476].

La soiurile analizate (Galactic, Sonor și Unirea) concentrația transcripțiilor genelor PR a fost semnificativ modificată. 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 activității 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, mai redusă decât martorul), în timp ce la s. Unirea s-a înregistrat o creștere a concentrației relative a transcripțiilor cu 12%. Un tablou similar a fost descris și pentru gena PR-10 (Tabelul 5.2, Figura 5.11).

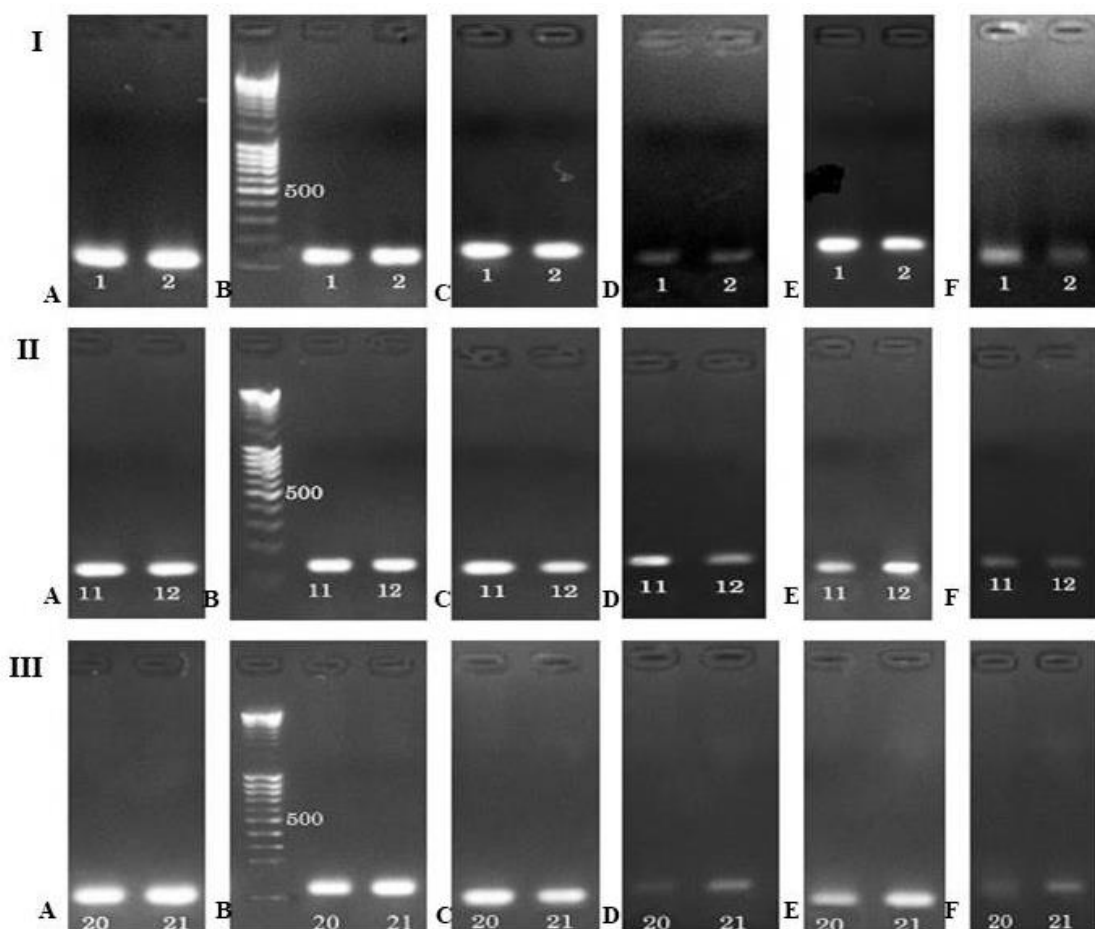


Fig. 5.11. Profilurile de amplificare a produselor primerilor pentru genele: α -tubulina (A), SOD (B), APX (C), PR-3 (D), PR-5 (E), PR-10 (F) la plantele variantei martor (1, 11, 20) infectate (2, 12, 21) a soiurilor Galactic (I), Sonor (II), Unirea (III).

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 prezintă activitate ribonucleazică, iar PR-3 - chitinazică și dețin o specificitate mai mare. Rolul diferitelor tipuri de proteine PR rămâne neclar 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 [476]. Sistemele gazdă-patogen analizate de noi au expus răspuns sistemic la infectarea cu VMDO, iar reacția diferită a fost conferită de particularitățile genotipului.

Expresia maximală a genelor legate de patogenеза a fost raportată pentru PR-5 pentru toate variantele experimentale. 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. Este cunoscut, că PR-5 este asociată cu stresul mediat de calea de semnalizare dependentă de etilenă sau jasmonat [236]. Se

consideră, că în plantele tinere, în condiții normale concentrația PR-5 este mica. În stare de patogeneză este relatată creșterea semnificativă a acestor proteine [412; 419].

Expresia genelor ce codifică proteinele PR-5 este indusă de mai mulți factori, inclusiv de diferite tipuri de agenți patogeni. A fost arătat, că acumularea acestor proteine corelează cu dezvoltarea rezistenței sistemice dobândite (RSD), proteinele PR-5 fiind considerate drept markeri ai RSD [262]. Creșterea expresiei genei PR-5 a fost constatată la genotipurile de floarea-soarelui infectate cu mană ceea ce, conform autorului, este într-o dependență directă de dezvoltarea RSD [373]. Se consideră că acumularea proteinelor PR depinde de tulpina patogenului [39]. Activitatea transcripțională a fost influențată mai puternic în cazul simptomelor acute. Plantele de soia infectate cu virusuri au prezentat o activitate a genei β -1,3-glucanazei sporită în cazul expresiilor patologice profunde, comparativ cu plantele infectate care nu manifestă simptome. Aprecierea spectrului electroforetic al proteinelor PR în extractele plantelor de *Datura stamonium* sănătoase și infectate cu diferite tulpini ale virusului X al cartofului a scos în evidență diferențe cantitative, care s-au dovedit a fi dependente de agresivitatea tulpinii virale [citată după 476]. Fitovirusurile sunt capabile să reprogrameze expresia genei gazdei, generând interdependența între activitatea transcripțională și patogenitatea virusului de tipul "shut-off" între intensitatea expresiei genelor și severitatea simptomelor virale [365].

Studiul interacțiunii susceptibile dintre cartof și tulpina VYC_{NTN} au remarcat modificări ale nivelului citochininei în frunzele inoculate [60]. Conform autorilor în formarea răspunsul primar patologic sunt antrenate genele asociate fotosintezei, de semnalizare a stresului abiotic și răspunsului defensiv. Expresia genelor în țesuturile clorotice infectate cu tulpina "sălbatică" a virusului mozaicului castraveților și două tulpini mutante ale proteinelor de acoperire au avut profiluri similare ale activității transcripționale, doar cu magnitudini diferite pentru tulpinile virale [300]. În condițiile patogenezei virale, similar stresului abiotic, multiple gene cuplate cu răspunsurile la cadmiu, căldură, frig și salinitate, au prezentat supraexpresie, în timp ce genele asociate cu fotosinteza au fost inhibitate.

Pe exemplul mai multor virusuri ARN, este expus efectul infecției virale asupra subexpresiei celor mai importante gene structurale ale gazdelor în frunzele infectate sistemic [176]. Gradul de supresie transcripțională este variat pentru diferite virusuri și gazde, fiind dependent de severitatea bolii. Efectul replicării virusului mozaicului mazării (*Pea Seed-Borne Mosaic Virus*) asupra acumulării proteinelor gazdei este complex și selectiv. Este demonstrată creșterea acumulărilor de vicilină, legumină și a peptidelor GBSS I, GBSS II, dar nu și a transcripțiilor lor în celulele infectate pe parcursul procesului de patogeneză, ceea ce sugerează impactul infecției virale asupra procesului translațional [419].

Expresia unor gene asociate proceselor antioidante și de patogeneză la descendenții de orz obținuți de la plante infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului. Pentru aprecierea statusului morfofiziologic al descendenților plantele obținute de la orzul infectat au fost supuse examenului virusologic. Prin tehnica contrastării negative a microscopiei electronice la descendenții plantelor infectate a fost confirmată lipsa germenilor virali. Cu toate că plantulele prezentau un aspect obișnuit și grad de dezvoltare normală, activitatea transcripțională a genelor asociate stresului biotic a fost modificată pentru majoritatea sistemelor analizate (Tabelul 5.6).

Tabelul 5.6. Activitatea transcripțională (unități convenționale) a unor gene a metabolismului antioxidant și defensiv în frunzulițele descendenților plantelor de orz infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului

Gene analizate	Genotip	Martor	Descendenții plantelor infectate
APX	Sonor	0,4527±0,0501	0,3342±0,0333*
	Galactic	1,2082±0,1369	0,2632±0,0253*
	Unirea	0,4253±0,0220	0,4563±0,0598
SOD	Sonor	0,6293±0,0527	0,4558±0,0523*
	Galactic	0,7197±0,0606	0,3173±0,0259*
	Unirea	0,5003±0,0556	0,4120±0,0634
PR-3	Sonor	0,0145±0,0023	0,0088±0,0009*
	Galactic	0,0720±0,0106	0,0120±0,0014*
	Unirea	0,0287±0,0022	0,0387±0,0037*
PR-5	Sonor	0,1382±0,0095	0,2305±0,0244*
	Galactic	0,1342±0,0189	0,2445±0,0219*
	Unirea	0,0972±0,0081	0,0903±0,0090
PR-10	Sonor	0,0098±0,0004	0,0082±0,0005*
	Galactic	0,1118±0,0144	0,0335±0,0021*
	Unirea	0,0202±0,0035	0,0153±0,0015*

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

La descendenții plantelor infectate ale s. Sonor și s. Galactic, concentrația relativă a transcripților genelor responsabile de activitatea antioxidantă a fost semnificativ redusă comparativ cu martorul [446]. 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 descendenți a deținut valori mai reduse comparativ cu efectul primar produs de infecția virală (Figura 5.12). Totodată, activitatea transcripțională a genelor APX și SOD la descendenții s.Unirea a prezentat un nivel proxim martorului.

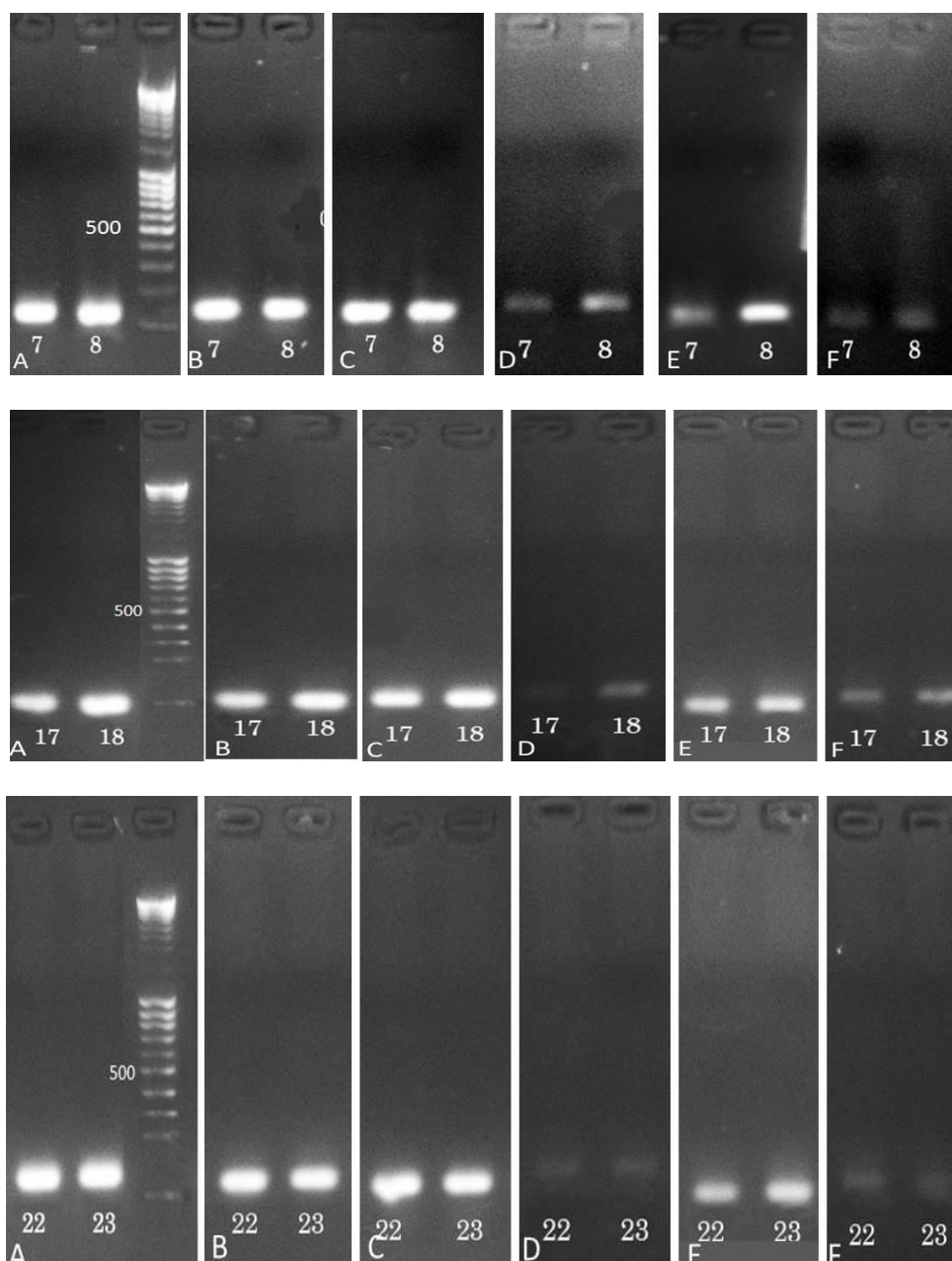


Fig. 5.12. Profilurile de amplificare a produselor primerilor pentru genele: α -tubulina (A), SOD (B), APX (C), PR-3 (D), PR-5 (E), PR-10 (F) la varianta martor (7, 17, 22) și descendenții plantelor infectate (8, 18, 23) a s. Sonor (7, 8), s. Galactic (17, 18) și s. Unirea (22, 23).

Conform rezultatelor evaluării activității transcripționale ale genelor asociate patogenezei (PR-3, PR-5 și PR-10) orientarea fluctuațiilor în direcția activării sau supresiei a fost dependentă de genotipul gazdei (Tabelul 5.12). Depresia 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 de plantele 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 (Figura 5.12).

Direcția variației concentrației transcripților PR-10 a avut caracter dependent de genotip. Astfel, la descendenții s. Galactic și s. Sonor a fost constatată subexpresia genei, iar la s. Unirea – supraexpresia genei.

Rezultatele analizei expresiei genelor metabolismului antioxidant și a proteinelor asociate patogenezei relevă orientările similare ale modificărilor la plantele infectate și descendenții derivați din condiții patologice (Figura 5.13).

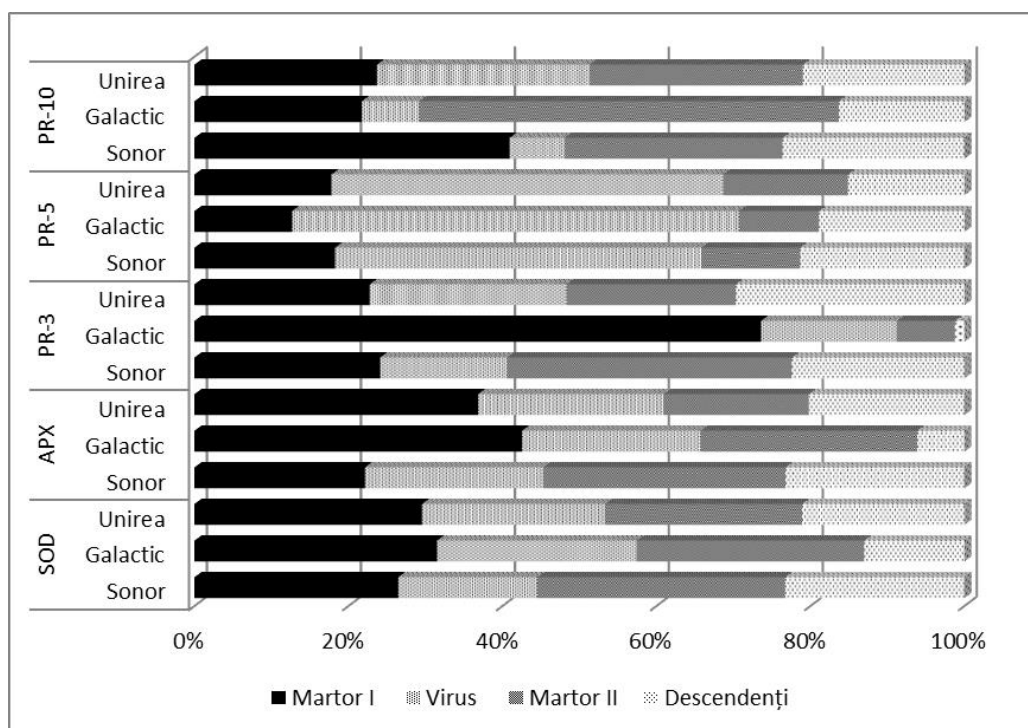


Fig. 5.13. Activitatea transcripțională (unități convenționale) a genelor asociate cu stresul în frunzulițele plantelor de orz sănătoase, infectate cu VMDO și descendenții acestora.

Efectul primar al infecției virale a avut o variabilitate mai mare a impactului comparativ cu descendenții. În sistemele gazdă-patogen analizate, concentrația relativă a transcripților genelor APX și SOD a suportat reducere, rezultat descris și în generația liberă de virusuri provenită de la plante obținute în condiții de patogeneză virală.

Un determinant important al variației activității transcripționale a genelor proteinelor asociate patogenezei PR-3 și PR-10 a constituit genotipul gazdei cu un nivel de sub- sau supraexpresie, specific combinației genotip-virus. O reacție comună pentru cele trei genotipuri de orz analizate, o constituie sporirea concentrației transcripților ARNm a genei PR-5 în condițiile patogenezei. La descendenții genotipurilor de orz de primăvară Sonor și Galactic

direcția modificărilor a păstrat aceeași orientare spre majorare, în timp ce la s. Unirea valoarea expresiei a fost la nivelul martorului.

Astfel pentru sistemele virus-gazdă evaluate și descendenții derivați de la plantele gazdă, s-au stabilit modificări evidente în activitatea transcripțională a genelor incluzând (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 patogeni, inclusiv a infecțiilor virale, asupra structurilor intracelulare se manifestă printr-o gamă largă de modificări care declanșează răspunsuri locale și sistemice prin multiple căi de transducție interconectate. Este bine cunoscut și amplu descris, că infecțiile virale afectează semnificativ procesele fiziologice în plante, determinând reducerea fotosintezei, modificarea respirației, nivelului de carbohidrați și metaboliți. În baza evaluărilor citologice ale diferitelor sisteme gazdă-patogen au fost descrise efectele produse de infecțiile productive ce contribuie la apariția restrukturărilor intracelulare, destabilizarea proceselor de reproducere celulară, modificarea expresiei genelor asociate stresului biotic. Conform datelor relatate, virusul mozaicului conopidei provoacă alterări majore structurale ale organelor sistemului energetic, vacuolar, precum și ale nucleelor celulelor mezofilului soiurilor de varză sistemic infectate. Calusurile derivate din diferite sisteme citopatice au prezentat modificări ale capacității morfogene.

În acest context a prezentat interes evaluarea distribuției conformaționale a structurilor nucleare în calusurile morfogene derivate din țesuturile mezofilului soiurilor de varză infectate cu VMCo. Studiul ultrastructural a relevat diverse modificări cu diferit grad de manifestare ale aspectului organelor celulare, inclusiv a nucleelor celulelor calusale obținute din mezofilul soiurilor susceptibile de varză Haricovscaia, Moldavanca și Iuniscaia infectate cu VMCo (Figura 5.14).

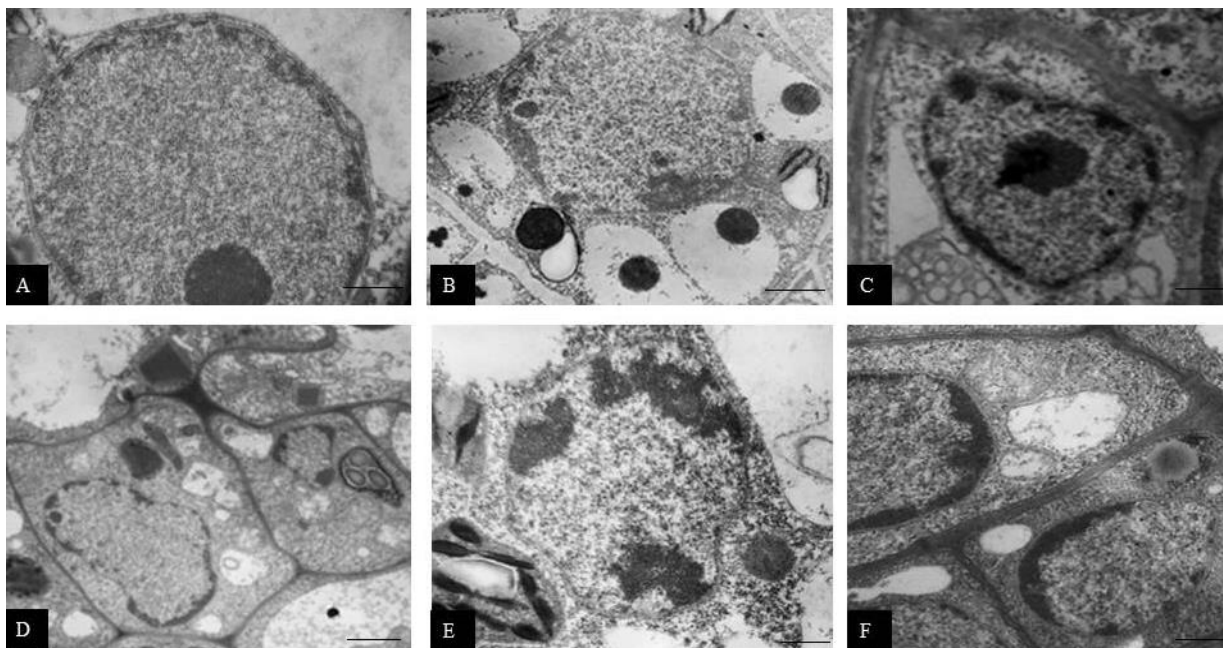


Fig. 5.14. Aspectul ultrastructural al celulelor calusale cu capacitate proliferativă, derivate din țesuturi ale mezofilului la soiurile de varză infectate cu VMCo. A – morfologia nucleului interfazic în calusul variantei martor a s. Haricovscaia. B – aspectul unui fragment al celulei calusale derivate de la s. Haricovscaia infectat cu VMCo; C – ultrastructura nucleului interfazic în calusul obținut din mezofilul plantelor s. Iuniscaia infectate cu VMCo; D – fragmente de celule în calusurile proliferative ale s. Moldavanca, varianta martor; E, F – morfologia structurilor nucleare și a organelor celulare în calusurile morfogene ale s. Moldavanca infectat cu VMCo (scara barei 0,8 μ m).

Aprecierile vizuale ale aspectului ultrastructural au relevat un tablou general proxim al celulelor calusale morfogene în variantele martor comparativ cu derivatele plantelor infectate exprimat prin caracteristici morfologice ale hialoplasmei, sistemului vacuolar, organelor sistemului energetic (plastidelor și mitocondriilor). Citoplasma celulelor calusale în variantele experimentale a menținut starea fin granulată cu multipli ribozomi, mitocondri compacți și plastide cu un sistem tilacoidal slab dezvoltat (Fig. 5.14 B-F). Sistemul vacuolar era format din mai multe vacuole mici divizate prin punți citoplasmice, reflectând în ansamblu o stare juvenilă caracteristică celulelor proliferative. Distincții vizuale au fost stabilite pentru incluziunile compușilor fenolici, numărul și dimensiunile cărora a fost mai înalt în variantele experimentale.

Celulele calusale ale variantelor martor se distingeau prin nuclee eucromatice cu zone neînsemnate de cromatină perimembranară, distribuții uniforme ale heterocromatinei nucleolare (Fig. 5.14 A, D). În celulele maselor calusale proliferative obținute din mezofilul plantelor de varză infectate cu VMCo se atestă sporirea zonelor de cromatină compactizată, în special, în zona perimembranară (Fig. 5.14 C, E, F). De asemenea, modificări apreciable vizual au putut fi estimate la nivelul gradului de compactizare a cromatinei nucleoplasmice. Sporirea

conglomerărilor de heterocromatină dispersată pe tot perimetrul nucleului a fost descrisă cu un grad diferit de expresie în nucleeele calusurilor derivate de la plante infectate.

Aplicarea analizei morfometrice a structurilor nucleare a confirmat devierile constatate vizual în variantele experimentale. La cele trei soiuri de varză analizate volumul relativ al nucleelor interfazice a fost mai înalt în calusurile variantelor experimentale (Tabelul 5.7).

Tabelul 5.7. Schimbările morfometrice ale structurilor nucleare în condiții *in vitro* a celulelor de varză albă infectate cu virusul mozaicului conopidei

Varianta experimentală	Raport 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.

Calusurile proliferative derivate din mezofilul plantelor infectate au prezentat nucleee cu un volum mai mare cu 21,5 – 30,4%, la nivelul de semnificație $P \leq 0,05$ și 0,01 respectiv. Modificări semnificative au fost raportate pentru cromatina perimembranară la toate trei soiuri analizate. 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. s.Moldavanca respectiv. Devierile volumului cromatinei nucleoplasmatică au prezentat o specificitate de genotip. Astfel, la s. Haricovscaia conglomeratele compacte de cromatină au înregistrat valori similare martorului, iar la s. Iuniscaia și Moldavanca au crescut cu 38,9 și

47,4%. Cu toate acestea raportul nucleo-citoplasmatic s-a majorat în toate sistemele experimentale [44].

Este cunoscut că sporirea zonelor de heterocromatină denotă diminuarea proceselor de transcripție și, în ansamblu, a activității nucleului [404]. Restructurările de compactizare a materialului genetic constatate în celulele proliferative ale țesuturilor mezofilului plantelor infectate reflectă repercusiunile generale produse în sistemele productive gazdă-virus.

În plantele infectate sistemic, virusurile sunt privite ca elisitori antrenați în inducerea diferitelor căi defensive, inclusiv în producerea efectului de poziție nucleopatică [271]. Drept argument se prezintă datele conform cărora VMCo declanșează la plantele de arabidopsis infectate sistemic un răspuns rapid în țesuturile neinfectate, care precedă propagarea virusului, și are ca rezultat o inducere locală sau sistemică a SRO, activarea diferențiată a diferitelor gene.

Conform relatărilor din literatură, dezvoltarea infecției virale corelează cu metilarea selectivă a diferitelor regiuni ale ADN-ului genomic, ceea ce duce la variații în activitatea lor transcripțională [73]. Aceste schimbări încep cu modificarea gradului de metilare a ADN-ului și conformaționale ale cromatinei, care pot juca un rol important în transducția efectelor în următoarele generații. Se consideră, că asemenea schimbări transgeneraționale fac parte din strategiile de apărare a plantelor la stresul biotic. Aceste modificări la nivelul populațional pot avea consecințe evolutive importante, pe măsură ce generează diversitate individuală. În acest context, este importantă dezvoltarea rezistenței plantelor la infecții ceea ce corelează cu metilarea selectivă a diferitelor regiuni ale ADN-ului genomic care conduce la schimbări în activitatea lor transcripțională [375].

Expresia specifică a genelor este reglată de starea conformațională diferențiată a cromatinei. Aceste modificări pot fi moștenite atât genetic, cât și epigenetic [72]. Un număr tot mai mare de dovezi sugerează că plantele posedă forme duale de moștenire pe baza mecanismelor genetice și epigenetice [271; 398]. Modificările în metilarea ADN-ului și nivelurilor conformaționale ale cromatinei sub presiunea agenților patogeni pot persista de-a lungul mai multor generații, ducând la formarea unei trăsături noi.

Infecțiile virale compatibile activează diverse semnale cum ar fi ARN-uri mici care se răspândesc sistemic de la locul infectării (de ex. frunze) la țesuturile neinfectate, inclusiv cele sporogene. Aici, semnalul conduce la sporirea sau diminuarea gradului de metilare al ADN-ului anumitor *site*-uri specifice. Este stabilit că hipermetilarea poate determina creșterea mutațiilor C/T, în timp ce hipometilarea generează majorarea frecvenței recombinărilor omoloage [327]. Ambele mecanisme genetice (mutațiile punctiforme) și recombinarea genetică conduc la

formarea de noi combinații, iar selectarea individuală dintr-o populație a epimutațiilor sau mutațiilor pot avea ca rezultat apariția epialelelor și alelelor care conferă noi specificități [73].

Concluzii la capitolul 5

1. Efectele destabilizatoare ale diviziunilor celulare provocate de infecțiile virale la tomate și orz, includ modificări ale procesului de recombinare somatică și meiotică; sporirea schimburilor reciproce, perturbarea coeziunilor dintre cromozomii omologi cu repercusiuni asupra generației ulterioare.

2. Infecțiile cauzate de VAT și VMT au generat abateri semnificative ale peroxidazei și polifenoloxidazei, exprimate prin sporirea activității PPO la genotipurile cu toleranță comparativ cu cele susceptibile.

3. Gradul de acumulare a α -tomatinei în pețiolii plantelor de tomate infectate este dependent de tipul de reacție al genotipului la infecția virală: susceptibilitate, toleranță sau rezistență, prezentând un nivel mai înalt în genotipurile cu potențial defensiv.

4. Expresia genelor implicate în metabolismul antioxidant (APX și SOD) și proteinelor asociate patogenezei (PR-3, PR-5 și PR-10) a fost semnificativ influențată la soiurile orzului de primăvară infectate cu VMDO, prezentând supra- sau subexpresie în dependență de genotip. Efectul mediat de infecția virală s-a manifestat în următoarea generație prin suprimarea activității genelor implicate în metabolismul antioxidant (APX și SOD).

5. În sistemele compatibile varză/VMT au fost raportate efecte nucleopatice de poziție, exprimate prin reconformări ale cromatinei, ce au inclus creșterea volumului relativ al heterocromatinei distribuite atașat membranei nucleare și devieri ale cromatinei nucleoplasmice cu specificitate de genotip. Restructurările constatate în gradul de compactare al materialului genetic au fost asociate cu un nivel proliferativ diferențiat dependent de tipul histopatosistemului. Eterogenitatea tisulară descrisă la nivel *in vitro* relevă susceptibilitatea diferențiată la nivel celular.

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 [137]. 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, varianță caracterelor [67]. Stabilitatea parametrilor și corelațiilor acestora constituie o reflecție specifică a consecințelor interacțiunii cu factorii ambientali.

Caracterele cantitative sunt determinate de multiple gene distribuite în genom, iar expresia valorică reflectă interacțiunile genice, dar și selecția individuală ca rezultat al interrelațiilor cu mediul [276]. Similaritatea dintre indivizi după anumite însușiri depinde de gradul de înrudire și amplitudinea varianței genetice care stă la baza caracterului. Drept surse de variație a caracterelor multigenice autorii indică epistaziile, dezechilibrarea *linkage*-ului.

În scopul extinderii variabilității pot fi utilizați și agenții exogeni cum sunt factorii fizici, chimici, dar și biologici, care ar provoca instabilitatea genetică și modifica gradul de *linkage* și nivelul de recombinare [463]. Spectrul variabilității genotipice la plante este condiționat nu numai de factorii de inducere și metodele aplicate, dar și de natura genetică a materialului inițial.

Recunoașterea rolului pe care îl au virusurile fitopatogene în procesul de inducere a recombinățiilor și mutațiilor sugerează importanța pe care le pot avea asupra expresiei caracterelor cantitative și calitative.

6.1. Variabilitatea caracterelor cantitative la tomate și descendenții plantelor infectate cu virusuri

6.1.1. Evaluarea caracterelor cantitative la plantele de tomate infectate cu virusul aspermiei tomatelor

Aspermia tomatelor se distinge printr-un impact semnificativ asupra habitusului plantelor infectate cu o potență mai majoră comparativ cu alți agenți virali. Aspectul general al plantelor sensibile la VAT prezintă modificări morfologice ale frunzelor, florilor și ale fructelor, gradul de expresie al căror este influențat de genotipul gazdei.

Evaluările fenologice comparative ale genotipurile de tomate susceptibile la VAT au demonstrat necesitatea estimării caracterelor cantitative. În baza cercetărilor s-a constatat influența diferențiată a VAT asupra expresiei însușirilor de productivitate (Tabelul 6.1).

Tabelul 6.1. Valoarea caracterelor cantitative la plantele de tomate infectate cu VAT (a. 1998)

Genotip	Caracter	Variantă	
		Martor	VAT
s. Nistru	Talia plantei (cm)	54,84±4,82	28,12±6,92**
	Lăstari laterali roditori (nr.)	5,81±1,08	5,38±1,07
	Ciorchine cu fructe per plantă (nr.)	18,24±2,89	4,52±4,89***
	Fructe pe ciorchina II (nr.)	2,80±0,79	2,70±0,82
	Masa unui fruct al ciorchinei II (g)	39,99±4,21	37,98±7,52
	Fructe per plantă (nr.)	21,76±2,96	13,81±2,25**
	Masa unui fruct (g)	36,96±2,98	23,94±2,35***
	Semințe per fruct (nr.)	69,64±3,04	47,24±2,94***
s. Prizior	Talia plantei (cm)	68,86±5,29	39,72±7,36***
	Lăstari laterali roditori (nr.)	5,91±1,17	5,48±0,93
	Ciorchine cu fructe per plantă (nr.)	17,71±3,09	8,29±2,24**
	Fructe pe ciorchina II (nr.)	3,02±0,92	1,80±0,63
	Masa unui fruct al ciorchinei II (g.)	48,62±2,29	39,85±3,05*
	Fructe per plantă (nr.)	27,71±3,09	16,52±4,75*
	Masa unui fruct (g)	37,99±1,19	23,11±4,68*
	Semințe per fruct (nr.)	74,61±2,33	47,94±7,88***
s. Fachel	Talia plantei (cm)	65,12±7,54	36,54±9,22**
	Lăstari laterali roditori (nr.)	5,76±1,04	5,85±1,15
	Ciorchine cu fructe per plantă (nr.)	15,95±2,38	8,50±2,49**
	Fructe pe ciorchina II (nr.)	3,20±0,63	1,60±0,84*
	Masa unui fruct al ciorchinei II (g.)	76,09±4,38	43,20±1,70***
	Fructe per plantă (nr.)	29,81±5,89	12,96±3,47**
	Masa unui fruct (g)	67,08±2,07	44,56±1,76***
	Semințe per fruct (nr.)	107,39±3,93	70,02±2,78***

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

VAT a cauzat diminuarea semnificativă a taliei plantelor la soiurile Nistru, Prizior și Fachel. Înălțimea lăstarului principal 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. În cazul infectării cu VAT acest parametru a variat în limitele variantei martor. La tomatele virozate a fost atestat un număr proxim de lăstari, iar reducerea distanței dintre noduri a conferit un aspect compact al tufelor și diminuarea taliei plantelor.

Perturbările proceselor microsporogenezei și morfofuncionale ale polenului au influențat în mod diferit gradul de legare și dezvoltare al fructelor. La infectarea cu VAT numărul de ciorchine cu fructe a scăzut cu 46,7 – 75% la s. Fachel și Nistru. Infecția virală a manifestat un

impact cu o putere similară și la s. Prizior. Numărul de fructe legate pe ciorchina II s-a diminuat semnificativ numai la s. Fachel. Variația valorii acestui indice la plantele infectate a s. Prizior nu a condus la deosebiri esențiale față de martor, în timp ce masa unui fruct de pe ciorchina II la s. Nistru a fost proxima plantelor sănătoase. Cu toate acestea, impactul infecției virale asupra masei medii a fructului per plantă a avut confirmare statistică la toate cele trei soiuri analizate, ceea ce a fost cauzat de accentuarea influenței negative a virozei asupra gradului de legare a fructelor. Astfel, progresarea procesului de patogeneză 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 [87]. Totodată VAT a cauzat diminuarea semnificativă a *numărului de semințe per fruct*.

În același timp, infecția produsă de VAT a condus la modificarea indicilor biochimici ai fructelor de tomate. Fructele formate în condiții de patogeneză dețineau într-o cantitate mai redusă zaharuri, în timp ce conținutul de substanțe uscate era mai înalt comparativ cu martorul. De asemenea, a fost diminuată semnificativ aciditatea totală a fructelor (Tabelul 6.2).

Tabelul 6.2. Valoarea indicilor biochimici ai fructelor de tomate la plantele infectate cu VAT (a. 1998)

Genotip	Caracter analizat	Variantă	
		Martor	VAT
s. Nistru	Substanțe uscate, %	5,56±0,05	5,66±0,07
	Coeficientul de variație	1,12	1,26
	Zahăr total, %	5,12±0,07	4,85±0,11*
	Coeficientul de variație	1,36	2,26
	Aciditatea, %	0,438±0,004	0,378±0,006***
	Coeficientul de variație	0,9	1,58
s. Prizior	Substanțe uscate, %	5,22±0,05	5,6±0,08**
	Coeficientul de variație	0,95	1,43
	Zahăr total, %	5,46±0,09	4,78±0,27**
	Coeficientul de variație	1,65	5,65
	Aciditatea, %	0,418±0,003	0,412±0,004*
	Coeficientul de variație	0,72	0,97
s. Fachel	Substanțe uscate, %	5,4±0,07	6,4±0,07***
	Coeficientul de variație	1,30	1,09
	Zahăr total, %	5,86±0,06	4,42±0,25***
	Coeficientul de variație	1,02	5,65
	Aciditatea, %	0,405±0,005	0,394±0,007***
	Coeficientul de variație	1,23	1,77

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

Indicii biochimici ai fructelor la plantele de tomate sănătoase se caracterizează prin-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 la s. Prizior și s. Fachel a depășit 5% , dovedind impactul semnificativ al infecției virale asupra metabolismului hidraților de carbon.

Este stabilit, că factorilor determinativi ai productivității și calității producției le revine o pondere majoră din întreg genomul. Astfel, din totalul QTL descrise la plantele de cultură, câte cca 14% sunt asociați acestor două caracteristici, iar 9% – arhitecturii plantelor [359].

6.1.2. Expresia caracterelor cantitative la descendenții plantelor de tomate obținute în condiții de patogeneză virală

Studiile recente indică că interacțiunile dintre plante și agenții patogeni se bazează pe mecanisme epigenetice [112; 222; 345]. Conform Boyko A., Kovalchuk I. [73], infectarea unei gazde sensibile cu un virus compatibil rezultă cu activarea diferitelor semnale cum ar fi inducerea ARNsi. Aceste semnale se extind sistemic de la locul de infecție spre țesuturile neinfectate, inclusiv țesuturile organelor generative. Infectarea este însoțită de hipo- sau hipermetilarea genelor specifice, schimbări de natură epigenetică ce pot fi transmise descendenților. La baza acestor modificări stau efecte genetice (mutații punctiforme și recombinarea genică) ce conduc la formarea de noi combinații alelice, care ulterior pot fi moștenite. Ca rezultat al mutațiilor sau epimutațiilor, gameții formați și indivizii rezultați pot deține noi combinații alelice ce prezintă noi îmbinări de caractere.

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.

La descendenți, precum și la plantele martor a fost studiat un șir de caractere morfologice: 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. Conform rezultatelor obținute la soiurile analizate valoarea medie a caracterelor studiate a fost la nivelul plantelor martor (Tabelul 6.3).

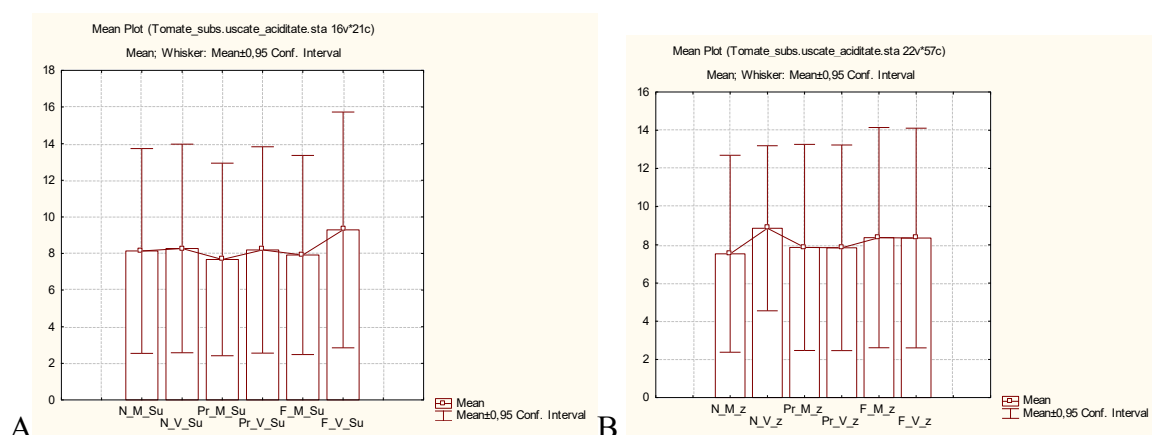
Descendenții plantelor infectate nu s-au evidențiat prin deosebiri semnificative ale caracterelor cantitative ce determină habitusul, dar și productivitatea. Asemenea parametri ca numărul și masa fructelor pentru care au fost înregistrate cele ample devieri de la martor la plantele virozate, au avut valori apropiate genotipurilor sănătoase.

Tabelul 6.3. Nivelul valoric al caracterelor cantitative la descendenții plantelor de tomate infectate cu VAT (a. 1998)

Genotip	Caracter	Variantă	
		Martor	Descendenți VAT
s. Nistru	Talia plantei (cm)	58,74±3,21	61,45±5,72
	Lăstari laterali roditori (nr.)	6,2±1,22	5,80±1,30
	Ciorchine cu fructe per plantă (nr.)	14,28±2,44	11,45±5,69
	Fructe pe ciorchina II (nr.)	2,66±1,07	2,82±0,96
	Masa unui fruct al ciorchinei II (g.)	38,56±3,86	39,42±4,12
	Fructe per plantă (nr.)	24,64±3,02	22,78±2,86
	Masa unui fruct (g.)	34,81±2,46	29,94±4,12
	Semințe per fruct (nr.)	67,08±2,78	61,83±4,44
s. Prizior	Talia plantei (cm)	63,73±3,21	65,12±5,37
	Lăstari laterali roditori (nr.)	6,04±2,05	5,78±3,26
	Ciorchine cu fructe per plantă (nr.)	14,66±2,78	12,36±2,48
	Fructe pe ciorchina II (nr.)	3,14±1,12	13,08±1,76
	Masa unui fruct al ciorchinei II (g.)	44,94±3,21	45,87±3,48
	Fructe per plantă (nr.)	32,18±2,19	29,50±4,02
	Masa unui fruct (g.)	34,45±3,08	35,11±2,98
	Semințe per fruct (nr.)	70,54±1,76	62,08±3,38*
s. Fachel	Talia plantei (cm)	61,94±4,44	65,26±6,12
	Lăstari laterali roditori (nr.)	5,62±1,22	5,70±2,18
	Ciorchine cu fructe per plantă (nr.)	14,63±2,67	13,60±3,11
	Fructe pe ciorchina II (nr.)	3,42±0,76	3,68±1,08
	Masa unui fruct al ciorchinei II (g.)	72,84±3,84	74,55±2,45
	Fructe per plantă (nr.)	26,73±3,38	24,64±4,69
	Masa unui fruct (g.)	69,02±2,31	64,28±2,98
	Semințe per fruct (nr.)	92,56±2,82	65,93±4,63***

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

Rezultate similare au fost constatate pentru indicii biochimici ai fructelor (Figura 6.1).



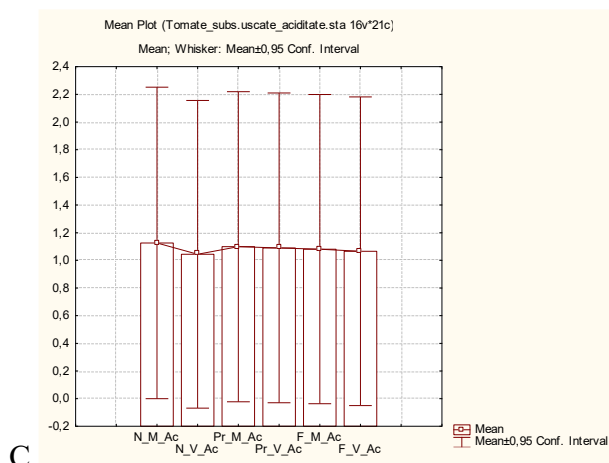


Fig. 6.1. Indicii biochimici ai fructelor de tomate obținute de la descendenții plantelor infectate cu VAT a s. Nistru (N), s. Prizior (Pr) și s. Fachel (F): A – conținutul substanțelor uscate, %; B – zahăr total, %; C – aciditatea totală, %.

Conținutul substanțelor uscate, zahărului, precum și aciditatea totală au înscris valori medii proxime matorului (Tabelul 6.4). Totodată, pentru unele caractere cantitative a fost stabilită o extensie a distribuției valorilor medii [42]. Asemenea parametri, precum ar fi talia plantei, numărul de ciorchine roditoare per plantă, masa unui fruct al ciorchinei II, numărul de semințe al unui fruct, au deținut un diapazon al variației mai mare la toate cele trei soiuri analizate (Tabelul 6.4). Date similare au fost raportate și pentru descendenții plantelor infectate cu VMT, efectele fiind constatate și în generațiile 2 și 3 [42; 49; 447].

Tabelul 6.4. Coeficientul de variație (%) al unor caractere cantitative la descendenții soiurilor de tomate infectate cu VAT (a. 1998)

Nr	Parametru	Genotip					
		Nistru		Prizior		Fachel	
		Martor	Descendenți	Martor	Descendenți	Martor	Descendenți
1	Talia plantei	5,46	9,30	5,03	8,24	7,17	9,38
2	Lăstari laterali 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 per 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

Pentru unele caractere, de exemplu *semințe per fruct*, amplitudinea coeficientului de variație a fost influențat prioritar de genotip. *Numărul de fructe per ciorchina II* la descendenții s. Nistru și s. Prizior infectate cu VAT a variat aproximativ în aceeași proporție comparativ cu martorul, în timp ce la s. Fachel a prezentat extinderea valorii acestui caracter de cca 2,7 ori. Evaluarea coeficientului de variație a scos în evidență particularități individuale dependente de genotip și caracter. Diferențe determinate specific de fiecare sistem individual au fost atestate și pentru *masa unui fruct per plantă*.

Rezultatele obținute au stat la baza elaborării procedurii de obținere a recombinanților de tomate [13]. Invenția se referă la biotehnologiile agricole și poate fi aplicată în scopul extinderii variabilității genetice în vederea obținerii și selectării unor forme cu caractere noi la soiurile de tomate prin aplicarea VAT în calitate de factor recombinogen. Ca rezultat al efectului produs de infecția virală poate fi modificată interdependența dintre unele caractere corelate, așa cum ar fi *masa fructului – numărul de semințe*. În așa mod au fost căpătate forme ale soiului Fachel cu masă mare a fructului și număr redus de semințe; masă mare a fructelor primelor ciorchine și conținut sporit de substanțe uscate.

Efectul transgenerational al infecției virale în extinderea variabilității caracterelor cantitative la tomate este demonstrat și pentru alte combinații gazdă-patogen, în dependență de gradul de reactivitate la agentul viral [26; 447].

Evaluarea polimorfismului intrapopulațional la descendenții de tomate obținuți de la plante infectate cu virusuri. Pentru evaluarea polimorfismului intrapopulațional a descendenților obținuți de la plante de tomate infectate a fost utilizată tehnica PCR cu utilizarea primerilor iPBS (*Primer Binding Site*) în baza retrotranspozonilor LTR (*Long Terminal Repeats*), propuși pentru amprentarea genomică, inclusiv la tomate [219]. Extracția totală a ADN-ului a fost efectuată utilizând protocolul „*GenomicDNA Purification Kit*” (*Fermentas*) cu modificări. Parametrii PCR au fost ajustați în funcție de lungimile ampliconilor și de specificul primerilor. Fragmentele amplificate au fost separate cu electroforeză cu gel de agaroză 1,1% (6 V/cm) în soluție tampon de migrare 1xTBE (pH 8,0) cu bromură de etidiu. Pentru identificarea primerilor eficienți în aprecierea diversității intrapopulaționale au fost analizați douăzeci de primeri iPBS, dintre care au fost selectați 2, care au prezentat polimorfism intragenomic. Conform rezultatelor studiului molecular, produsele de amplificare cu primeri iPBS au prezentat diferențe calitative (Figura 6.2).

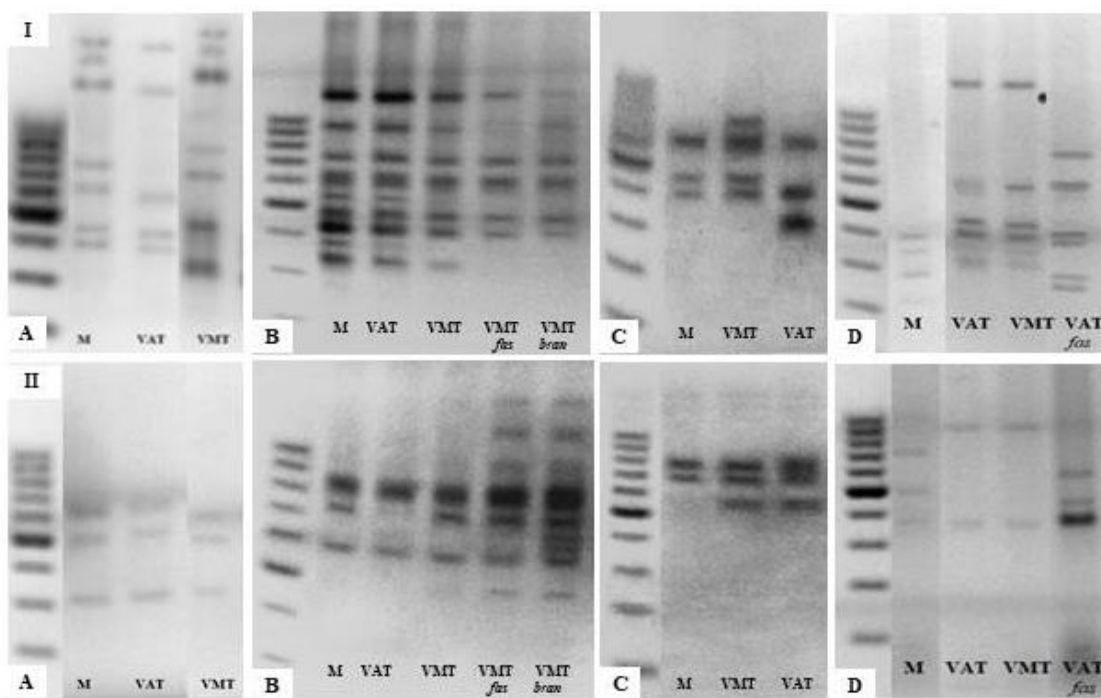


Fig. 6.2. Electroforegramele produșilor de amplificare ale ADN-ului genomic al descendenților de tomate obținuți de la plante infectate cu virusuri: A – s. Craigella (Tm-2²/Tm-2²), B – s. Craigella (Tm-1/Tm-1), C – s. Elvira, D – sp. *S. pimpinellifolium*. Rezultate amplificării cu ajutorul primerilor iPBS: I – 17pb, II – 20 pb.

Un profil cu un număr mai mare de benzi a fost identificat la s. Craigella (Tm-1/Tm-1) generat de primerul 17 pb. La plantele martor a genotipului dat au fost descriși 10 ampliconi, care au fost atestați și la descendenții derivați de la plantele infectate cu VAT. Diferențe au fost stabilite în variantele derivate de la plante infectate cu VMT. Trebuie de menționat, ca deosebiri calitative după produșii de amplificare au fost remarcate și între indivizii aceleiași variante, care se deosebeau după aspectul morfologic. Astfel, variații morfologice ale tulpinii, tipului de inflorescență, descrise la descendenții s. Craigella (Tm-1/Tm-1) au fost asociate cu prezența unor fragmente unice (Figura A 6.2). Rezultate similare au fost descrise și pentru descendenții sp. *S. pimpinellifolium* infectate cu VAT ce prezentau modificări ale fructului (numărul de locule (lc), fascierea fructului (fas)) (Figura A 6.4). Tipul variațiilor morfologice a fost identificat după descrierea mutanților conform bazei *Micro-Tom Mutants* [194].

Analiza moleculară cu primerul iPBS – 20pb a scos în evidență mai puține fragmente (2-3 polimorfe și 1-7 monomorfe). Descendenții plantelor infectate (genotipurilor *S. pimpinellifolium* infectate cu VAT, s. Elvira infectat cu VMT și VAT) au expus variații morfologice ale habitusului, frunzelor, inflorescențelor, fructului, modificări asociate cu fragmente monomorfe.

Astfel, conform profilurilor de amplificare a fost demonstrată o specificitate intrapopulațională dependentă de combinația gazdă-patogen, asociată cu aspectul morfologic.

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 [23; 459]. Conform autorilor, infectarea plantelor de orz cu VMDO a cauzat modificări a mai multor caractere cantitative. Este cunoscut faptul, că infecțiile virale, inclusiv cea provocată de VMDO influențează productivitatea plantelor de orz. Conform datelor din literatură, numărul de boabe per spic corelează direct cu productivitatea și este un indice mult mai sensibil față de viroze [324]. În cadrul cercetărilor efectuate infecția virală a influențat semnificativ ($P \leq 0,001$) asupra variației *numărului de boabe per spic*, puterea de influență fiind de 6,2%.

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 soi. O plasticitate mai sporită evidențiată la soiul Galactic în cazul aplicării complexe a VMDO cu razele gama este expusă și în alte lucrări [459]. Variația caracterului *numărul de boabe per spic* la descendenți a fost mai înaltă comparativ plantele infectate. Potrivit rezultatelor autorului la soiul Galactic deviațiile în $M_2 - M_3$ sporesc semnificativ, atingând 90,8% în generația a treia, ceea ce este de 6,4 ori mai mare în comparație cu martorul.

Evaluarea gradului de variabilitate a caracterului *frați fertili per plantă* a evidențiat o variație puternică la varianta virus, cât și la descendenții plantelor infectate. În rezultatul acțiunii VMDO, deviațiile valorice ale acestui indice s-au majorat de 1,2 – 1,36 ori la descendenții s.Sonor și s.Galactic. Puterea impactului infecției asupra parametrilor *taliea plantei*, *lungimea ultimului internod*, *frați fertili per plantă* a variat cu o amplitudine diferită la descendenți și a fost specifică caracterului evaluat. Puterea de influență a VMDO asupra *taliei plantei* a fost de 11,88% și *lungimii ultimului internod* – de 39,15%.

În rezultatul cercetării influenței VMDO asupra manifestării caracterelor cantitative (*taliea plantei*, *lungimea spicului principal*, *lungimea ultimului internod*, *numărul de boabe per spic*, *numărul fraților fertili per plantă* și *numărul internodurilor*) s-a constatat o variație semnificativă a valorilor coeficienților de variație a caracterelor studiate la plantele supuse acțiunii infecției virale și pe parcursul următoarelor generații, în dependență de genotip, generație și indicele bio-morfologic studiat.

Suplimentarea acțiunii produse de VMDO cu raze gama a dovedit posibilitatea majorării variabilității genotipice și diversificării caracterelor cantitative la soiurile de orz. În baza acestor

date inovative a fost elaborat un procedeu nou de obținere a genotipurilor noi cu caractere de interes agronomic [10], esența căruia rezidă în inducerea diversității genotipice și selectarea formelor ce prezintă valori nespecifice soiului inițial ale unor așa caractere cantitative cum ar fi *taliea plantei, lungimea ultimului internod, lungimea spicului, numărul de spiculețe dezvoltate, numărul de internoduri* la descendenții obținuți de la plantele de orz supuse acțiunii asociate ale infecției virale și razelor gama.

6.2.1. 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 alelică și poate fi apreciată prin analiză electroforetică. Totalitatea spectrelor proteinelor multiple (poligenice) și genetic polimorfe (polialelice) permite evidențierea poligeniei, structurii alelice a genelor, structurii populației, compoziției biotipice a soiului.

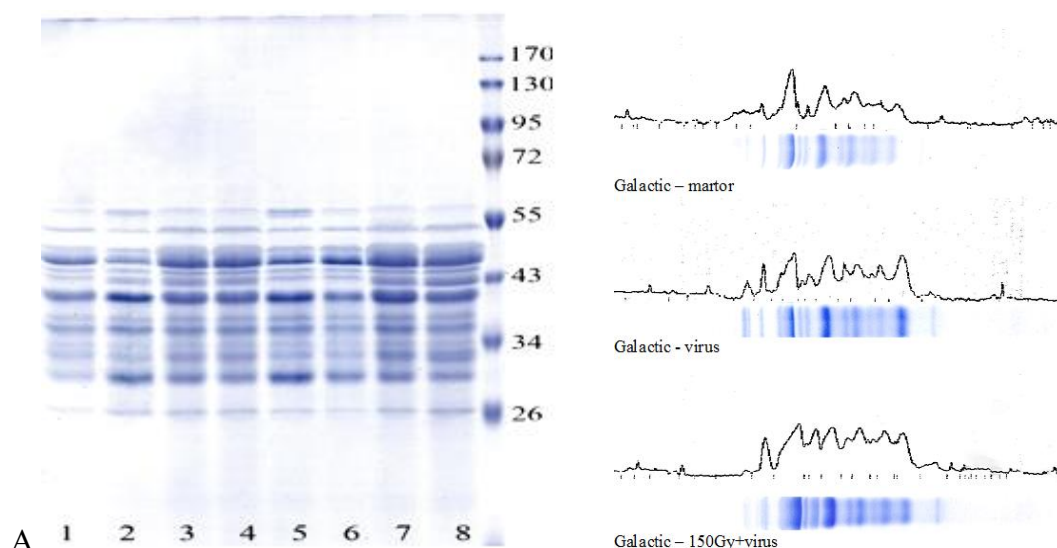
Polimorfismul proteinelor, drept metodă de marcă moleculară, este aplicată în identificarea genotipurilor, fiind utilizată nu doar în cercetările fundamentale, dar și în soluționarea numeroaselor probleme aplicative. În baza spectrelor electroforetice ale proteinelor polimorfe este posibilă determinarea diversității genetice, rezultatele servind repere în cercetările interpopulaționale, filogenetice (pentru determinarea nivelului de înrudire a genotipurilor), aspecte evoluționiste, marcarea genelor ce controlează caractere de interes [28; 466; 470; 487].

În evaluarea polimorfismului în populațiile de orz, conform datelor din literatura de specialitate, eficient se utilizează asemenea marcheri proteici ca hordeinele [484], conținutul cărora constituie cca 40% din totalul proteinelor de rezervă din semințe [380]. Hordeinele se consideră a fi una din cele mai polimorfe sisteme [118; 381], componenții proteici fiind determinați de șapte loci: Hrd A (=Hor 1), Hrd B (=Hor 2), Hrd C, Hrd D, Hrd E, Hrd F (=Hor 5) și Hrd G (=Hor 4), localizați în brațul scurt al cromozomului 5. Pentru locii Hrd A, Hrd B și Hrd F sunt descrise o serie de alele: 154 pentru Hrd A, 269 - Hrd B și 5 - Hrd F [484].

Conform Abbo S. și coaut. [31], hordeinele se împart în patru grupuri. Însușirile biochimice și componența aminioacidică a diferitelor tipuri diferă mult, inclusiv după numărul și stabilitatea legăturilor disulfidice [381]. În procesul de extracție în dodecilsulfat de sodiu hordeinele se separă în fracțiile: A, B și C, cea din urmă fiind alcătuită din componenți săraci în grupe sulfurice [131; 381]. Fracția C cuprinde polipeptide cu masa moleculară cuprinsă între 67,000 și 86,000 Da, B-hordeinele între 30,000 și 60,000 Da, iar A-hordeinele între 13,000 și

20,000 Da [380]. Faulks A. et al. [138] indică pentru fracția C o masă moleculară cuprinsă între 50,0 kDa și 70,0 kDa. Fracția A conține 2,6% lizină și este solubilă în alcool sau izopropanol [119]. Se consideră, că fracțiile B și C constituie majoritatea deplină, însumând cca 95% din totalul de hordeine [135], iar fracția A reprezintă doar 1-2% [294]. Autorii constată, ca această componentă nu ar prezenta hordeine adevărate. Comun pentru toate tipurile de hordeine este conținutul ridicat de prolină și glutamină și redus de lizină [348].

Analiza electroforetică a hordeinelor extrase din semințele s. Galactic, s. Sonor și s. Unirea a pus în evidență polipeptide cu masa moleculară cuprinsă între 26,000 și 72,000 Da, cele mai multe fracții fiind distribuite între 55,000 și 72,000 Da, ceea ce corespunde datelor expuse în literatură și pentru alte genotipuri de orz. Conform rezultatelor electroforezei, pentru fiecare soi analizat a fost stabilit spectrul tipic al fracțiilor proteice. 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). Compararea spectrelor a constatat cele mai multe fracții la s. Unirea (15), un număr proxim a fost remarcat la s. Galactic (14), în timp ce la s. Sonor au fost descrise doar 10 benzi polipeptidice. Infecția virală asociată sau separată de razele gama au indus unele variații cantitative și calitative în spectrul hordeinelor. La s. Galactic razele gama în doza de 100 Gy au indus doar diminuarea cantitativă a componentelor proteici, în timp ce dozele de 150 Gy și 250 Gy au cauzat majorarea cantității izoformelor descrise la martor. 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 (Figura 6.3).



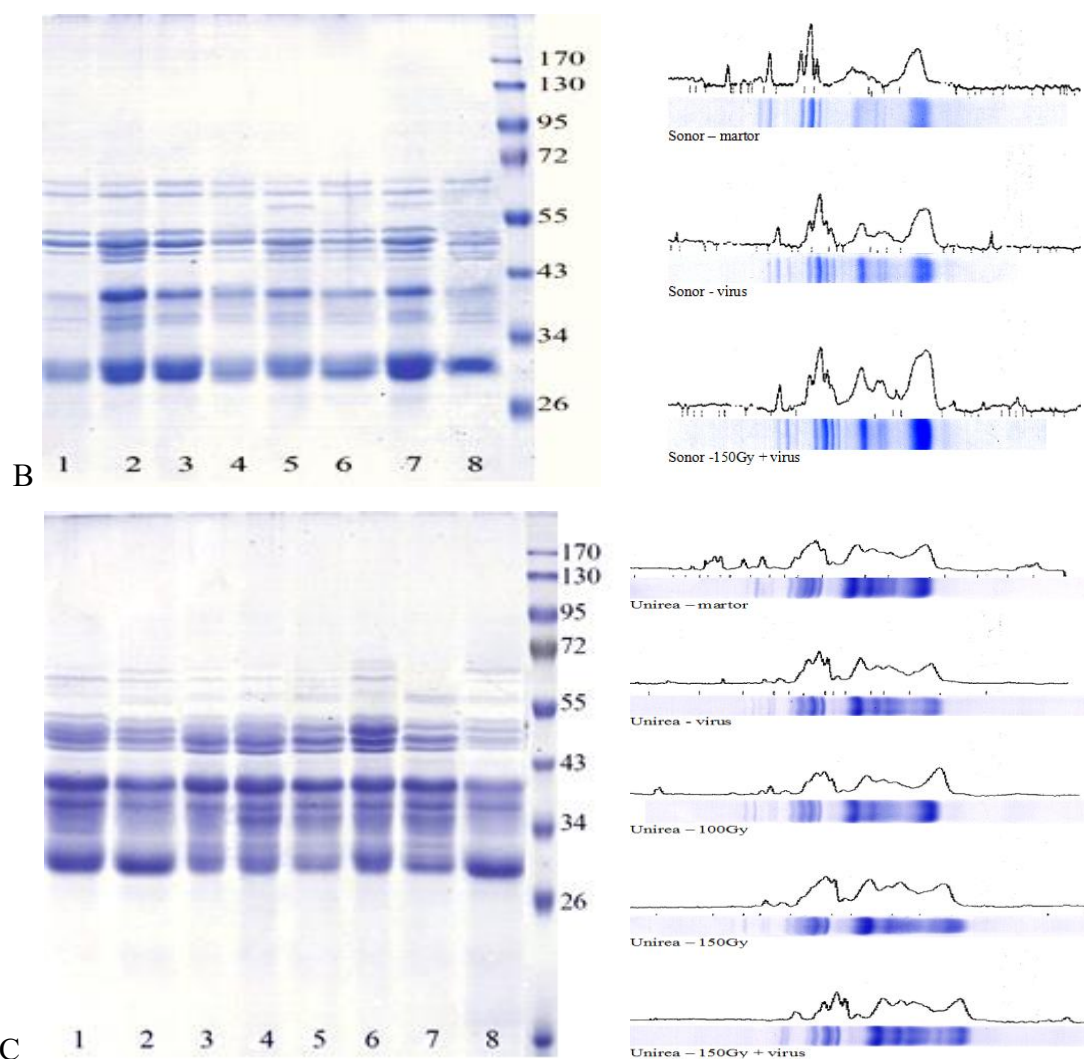


Fig. 6.3. Electroforegrama și densitograma hordeinelor în cariopsele de orz ale soiurilor: Galactic (A), Sonor (B), Unirea (C), conform variantelor: 1 – martor; 2 – 100 Gy; 3 – 150 Gy; 4 – 250 Gy; 5 – virus; 6 – 100 Gy+ virus; 7 – 150 Gy+virus; 8 – 250 Gy+virus.

Iradieră s. Galactic în doză 150 Gy în asociere cu infecția virală, a condus la formarea unei forme noi cu masă moleculară de 55 kDa. În spectrele hordeinelor extrase din semințele plantelor lotului cu aplicarea razelor gama în doză de 250 Gy în complex cu infecția virală au fost remarcate variații doar cu caracter cantitativ.

O bandă nouă ce reprezintă o fracție cu Mr 62 kDa a fost estimată în loturile s. Sonor cu influență a infecției virale separat sau în asociere cu razele gama în doză de 150 Gy. Razele gama în doză 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 doză 150 Gy (Figura 6.3 B). Inducerea unei benzi cu Mr 32 kDa a fost remarcată la s. Unirea în cazul infecției virale, aplicării razelor gama în doză 150 Gy sau 250 Gy, precum și a razelor gama 150 Gy în complex cu VMDO. Razele gama în doză 100 Gy în comun cu infecția virală au cauzat apariția unei fracții

69 kDa, iar iradierea separată în doză 100 Gy a condus la apariția unei forme noi cu masă moleculară 58kD. Dispariția unor benzi ce corespund fracțiilor cu Mr în diapazonul 32,4-37 kDa a fost remarcată pentru loturile cu acțiune a razele gama în doză de 100 Gy sau 150 Gy (Figura 6.3 C).

Inducerea unui polimorfism pronunțat al hordeinelor exprimat prin prezența sau absența unor fracții proteice este descrisă la unii mutanți ai orzului. Sunt cunoscuți trei mutanți după hordeina C, obținuți în baza soiului Одесский 46: M 564, M 109 și M 88, ce conțin un număr variat de componente [367]. La mutanții M 109 și M 5654 se constată dispariția a câte o bandă polipeptidică (cu masă moleculară 48,5 kDa și 57,5 kDa respectiv), iar la M88 apariția unei benzi noi. Conform [131] în extractele alcoolice ale hordeinei prin electroforeza în dodecilsulfat de sodiu la diferite genotipuri de orz pot fi înregistrate în medie 10-17 polipeptide și maximal până la 26 fracții polipeptidice.

În baza evaluării hordeinelor la 228 soiuri de orz, Поморцев А. [486] remarcă o distribuție neuniformă și o frecvență diferită a locilor *Hrd A*, *Hrd B* și *Hrd F* dependente de regiunea geografică de proveniență a materialului analizat, constatând o interlegătură cu factorii climatici (temperatura, umiditatea).

Tipul hordeinelor se stabilește încă în perioada formării bobului și a endospermului prin expresia genelor codificatoare respective [348]. Hordeinele se sintetizează de către ribozomii reticulului endoplasmatic, fiind retrograd transportate în reticulul endoplasmatic, unde are loc plierea acestora cu implicarea mai multor fermenți [323]. Ulterior polipeptidele sunt depozitate în lumenul vacuolar unde în urma agregării se formează corpusculele prolaminice. Genele ce determină sinteza hordeinelor se află sub influența multiplor factori endo- și exogeni [468]. Este cunoscută influența regulatorilor de creștere, inclusiv a acidului abscizic, citochininelor asupra expresării genelor hordeinelor [228].

Spre deosebire de caracterele morfologice, markerii proteici ce se moștenesc codominant reflectă însușirile ambelor alele. Totodată aceste proteine permit depistarea restructurărilor cromozomale. Tipul polipeptidelor poate fi condiționat și de modificările posttranslaționale realizate pe contul glicozilării, metilării, fosforilării, proteolizei [466].

Diversitatea mare a hordeinelor condiționează informativitatea înaltă a acestora. Analiza electroforetică a hordeinelor contribuie în cel mai direct mod la soluționarea multor probleme aplicative, fiind utilizată în identificarea genotipurilor de orz. De exemplu, un interes deosebit prezintă formele cu deficiența de lizină ce prezintă o calitate mai superioară a malțului [485]. Pe modelul profilurilor polipeptidice a 13 genotipuri de orz este constatată o corelație negativă între prezența unor fracții ale componentului B și calitatea malțului [131].

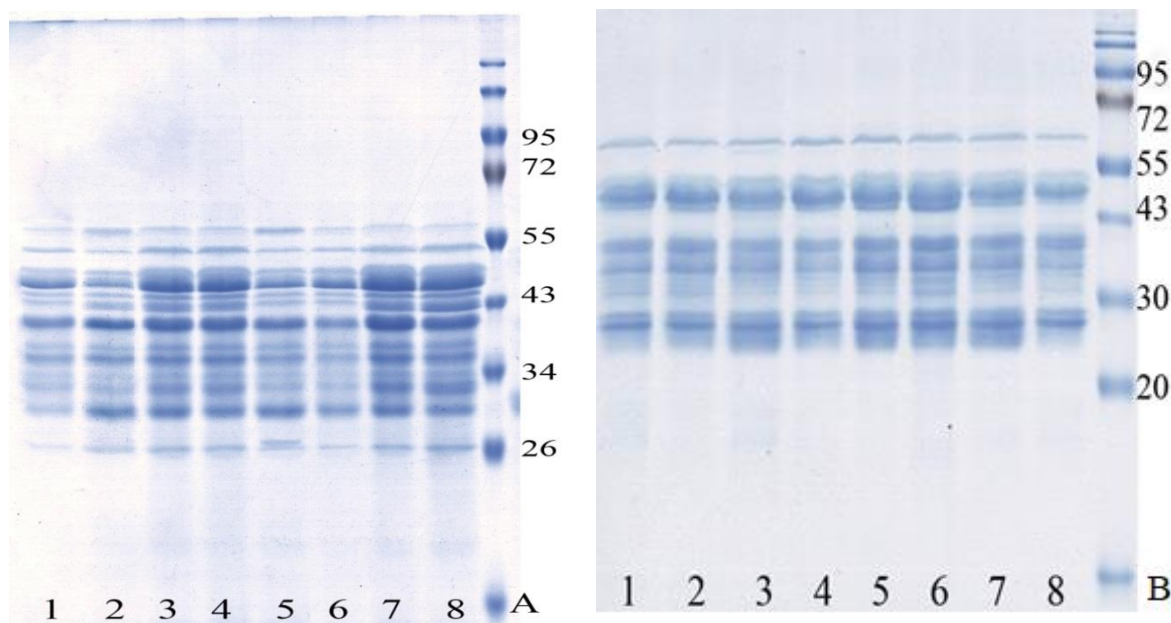
Sunt cunoscuți loci ai hordeinei înălțuți cu Ml-a ce controlează rezistența orzului la fungi, ceea ce permite aplicarea analizei electroforetice a hordeinelor în identificarea formelor homozigote după gena rezistenței, precum și în selectarea genotipurilor cu un complex de caractere valoroase [466]. Conform Nevo E. și coaut. [319] polimorfismul hordeinelor poate fi utilizat în evaluarea potențialului adaptiv al genotipurilor. Studiul prolaminelor a patru subpopulații spontane din cadrul speciei *H. spontaneum* Koch. a scos în evidență relații corelative între formele fenotipice și condițiile micro-geografice de creștere a lor.

Generalizând rezultatele obținute constatăm inducerea unui polimorfism al hordeinelor manifestat specific genotipului analizat și factorului aplicat. Cele mai variate profiluri polipeptidice au fost descrise la s. Unirea, ce a prezentat atât apariția de noi benzi, cât și dispariția altora [14]. Variația tipului de polipeptide ale hordeinei la plantele infectate cu virus denotă posibila influență a VMDO separat, precum și în asociere cu razele gama, asupra materialului genetic prin inducerea restructurărilor sau modificărilor epigenetice.

6.2.2. Variabilitatea biotipică a descendenților orzului de primăvară obținuți în condiții de infecție virală în baza polimorfismului proteinelor de rezervă

Conform profilurilor eletroforegramelor, la plantele martor ale s. Galactic, s. Sonor și s. Unirea, similar rezultatelor anterioare, au fost identificate polipeptide cu masa moleculară între 26,000 și 72,000 Da. 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 descendenților plantelor infectate au variat calitativ și cantitativ față de martor (Figura 6.4).



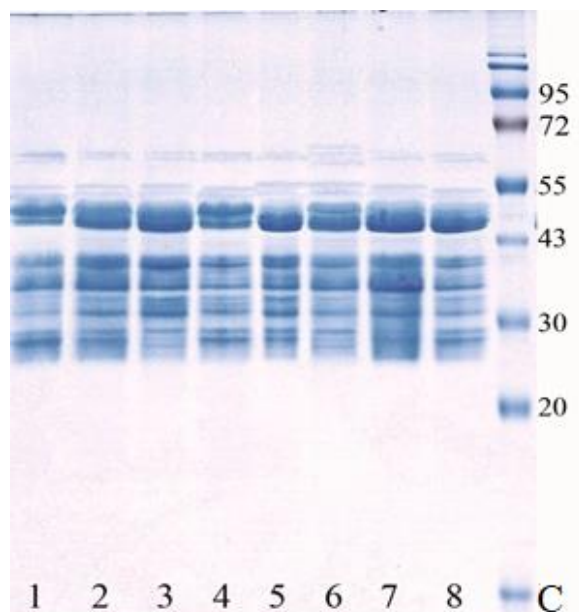


Fig. 6.4. Electroforegrama hordeinelor în cariopsele de orz la soiurile: A – Galactic (), Sonor (B), Unirea (C): 1 – martor; descendenții variantelor: 2 – 100 Gy; 3 – 150 Gy; 4 – 250 Gy; 5 – virus; 6 – 100 Gy+virus; 7 – 150 Gy+virus; 8 – 250 Gy+virus.

Descendenții s. Unirea și s. Sonor iradiate cu raze gama în doza 150 Gy au păstrat variațiile identificate în cariopsele plantelor crescute din semințe iradiate, iar în populația generației derivate de la plante infectate au apărut noi polipeptide. Astfel, în profilul electroforetic al hordeinelor descendenților VMDO se atestă izoforma cu masa moleculară 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 s-au exprimat și la descendenții acestor genotipuri.

În spectrul hordeinelor s. Sonor la generația variatei cu aplicare a razelor gama în doza 150 Gy a fost identificat un component nou cu masa moleculară 62 kDa, care s-a detectat la formele parentale. Similar, la descendenții s. Unirea obținuți de la plante infectate și iradiate cu 100 Gy s-a stabilit polipeptida 69 kD ce a lipsit de la variantele inițiale [448].

Diferențele stabilite în baza analizei profilurilor electroforetice ale hordeinelor indică o eterogenitate generată de infecția virală separat sau în asociere cu razele gama. Aceste rezultate pot fi explicate prin instabilitatea proceselor de diviziune celulară descrisă la plantele infectate și repercusiunile structurale și funcționale la descendenții acestora.

6.2.3. 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 [479]. Este cunoscut, că un rol important în asigurarea adaptabilității este acordat peroxidazelor [317]. De rând cu aceste enzime, esterazele dispun de eterogenitate determinată genetic, ceea ce favorizează aplicabilitatea lor în asemenea studii [479].

În acest scop ne-am propus evaluarea polimorfismului peroxidazelor și esterazelor în populațiile orzului de primăvară obținute în condiții de infecție virală [5]. Analiza electroforetică a peroxidazelor extrase din frunzulițele s. Galactic, s. Sonor și s. Unirea a pus în evidență izoforme cu mobilitate cuprinsă între 0,073 și 0,944. Conform rezultatelor electroforezei pentru cele trei soiuri analizate au fost stabilite forme identice caracterizate cu o mobilitate minoră ($0,073 \div 0,363$) și majoră ($0,773 \div 0,94$), iar pentru izoformele cu mobilitate medie s-au depistat variații atât între soiuri, cât și în cadrul diferitelor variante ale aceluiași genotip (Figura 6.5).

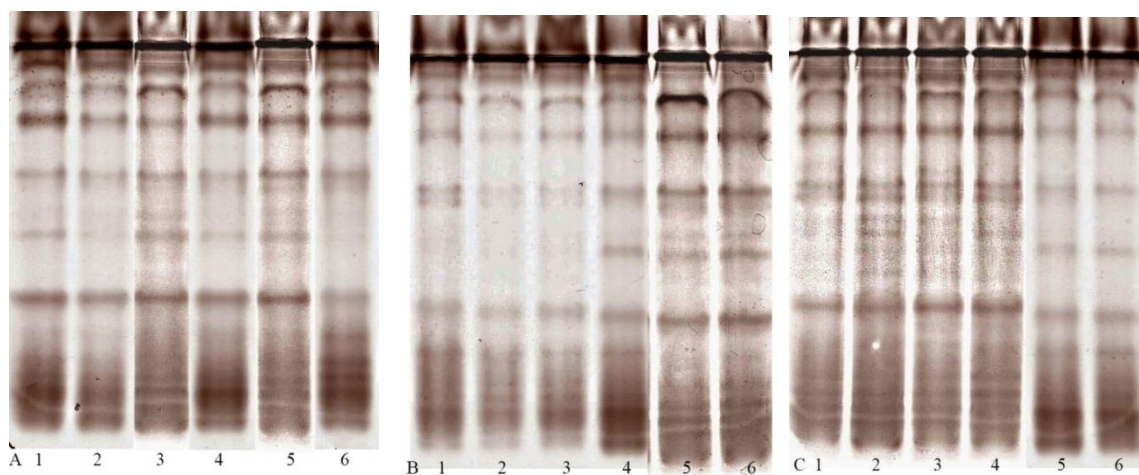


Fig. 6.5. Electroforegrama peroxidazelor în frunzulițele plantulelor de orz de primăvară ale soiurilor Galactic (A), Sonor (B) și Unirea (C) conform variantelor experimentale: 1 – martor, 2 – virus, 3 – 100, 4 – virus+100 Gy, 5 – 150 Gy, 6 – virus+150 Gy.

Mai multe izoforme ale peroxidazei la varianta martor au fost atestate la plantulele soiului 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 în spectrul peroxidazelor. Modificări cantitative au fost atestate 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. Conform profilurilor electroforetice, la descendenții s. Unirea derivați 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

asupra plantelor recurente a razelor gama cu doza 100 Gy separat sau complementar infecției virale. Tendințe similare au fost atestate și în variantele cu utilizare a dozei 150 Gy cu sau separat de VMDO.

Analiza electroforetică a polimorfismului esterazelor denotă devieri mai expresive între variantele evaluate (Figura 6.6).

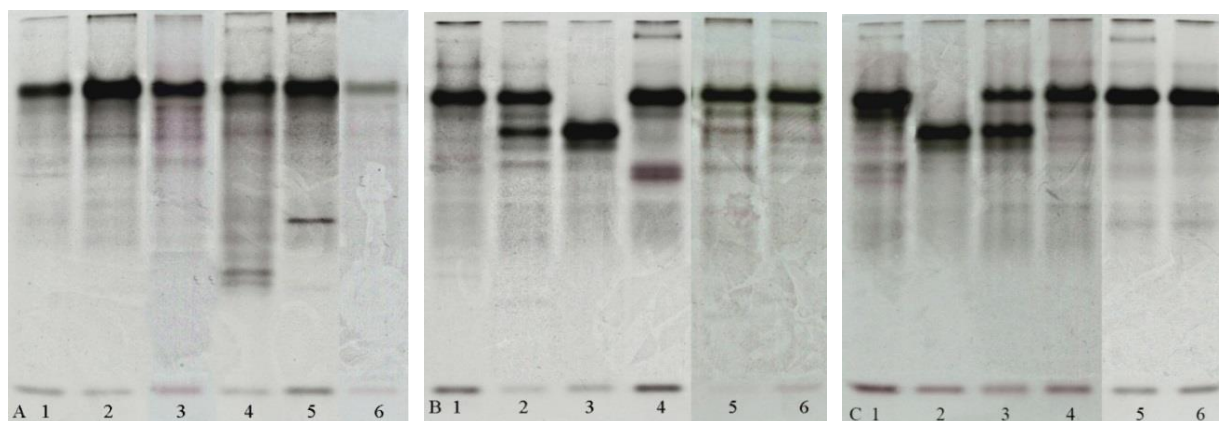


Fig. 6.6. Electroforegrama esterazelor în frunzulițele plantulelor de orz de primăvară ale soiurilor Galactic (A), Sonor (B) și Unirea (C) conform variantelor experimentale: 1 – martor, 2 – virus, 3 – 100 Gy, 4 – virus+100 Gy, 5 – 150 Gy, 6 – virus+150 Gy.

În profilurile electroforetice ale esterazei la soiul Galactic martor au fost atestate doar cinci benzi, în timp ce condițiile patologice au generat sporirea activității acestei enzime și majorarea polimorfismului. Numărul de izoforme în cazul aplicării infecției virale în complex cu razele gama 100 Gy a atins valoarea de 12. Totodată se atestă apariția de noi componente cu mobilitatea cuprinsă între $0,456 \div 0,712$, s. Galactic prezentând cea mai majoră diversitate. Razele gama în doza 150 Gy separat sau complementate de infecția virală au cauzat modificări ce au indus reducerea activității și polimorfismului esterazei. Trebuie de remarcat, că în toate variantele experimentale ale s. Galactic cea mai intensă activitatea a fost remarcată pentru izoforma cu mobilitatea 0,198. Date similare au fost atestate și pentru s. Sonor cu excepția variantei 100Gy. În cazul s. Unirea a variantei „Virus” componentul cu $rf=0,198$ nu a fost identificat, iar cea mai înaltă activitate a fost remarcată pentru izoforma 0,303.

Kahler A. și Allar R. [218] raportează 21 variații ale esterazei în frunzulițele tinere de orz, determinate de 7 loci, autorii descriind pentru prima dată izoformele Est 1, 2, Est 4 – 8. Autorii Hvid S. și Nielsen G. [202] indică 27 forme controlate de 10 loci, dintre care Est 3 și Est 10 specifice pentru embrioni și scutelum.

Conform [218] locilor Est 6, 7 și 8 prezintă stabilitate și sunt mai puțin influențate de diverși factori. În cercetările noastre izoformele specifice acestor loci au fost remarcate doar în variantele „Virus” și „100Gy+virus” a s. Galactic, ceea ce probabil este datorat specificității

soiurilor analizate. Aceiași sursă indică, că pentru locusul Est 1 sunt identificate 2 alele cu mobilitate și frecvență diferită: alela Est 1Ca codifică izoforma Est 1 cu o mobilitate mai mare și o frecvență de $90,2 \pm 4,6\%$, în timp ce alela Est 1Pr prezintă o mobilitate mai redusă și frecvența $9,8 \pm 4,6\%$. De asemenea, două alele cu diferită mobilitate sunt raportate pentru esteraza 12 [479].

Conform [318] locile Est 1 – Est 2 sunt strâns linkați și între ei nu se realizează nici o recombinare. La s. Unirea, martor, pentru care se disting ambele aceste izoforme, în variantele experimentale se atestă doar componenta Est 2, ceea ce probabil confirmă efectul recombinogen al factorilor aplicați.

Izoforma Est 5 este distribuită în regiunea mediană și se caracterizează prin colorație roșietică [174]. În cercetările noastre această izoformă a prezentat o variabilitate sporită între variantele experimentale.

Din literatura de specialitate este cunoscută localizarea locilor ce codifică esterazele pe cromozomii de orz [127], precum și interrelațiile dintre anumite caractere biochimice și morfologice. Astfel, se indică, că locii Est 5 și Pgd 1 (fosfo-gluconatdehidrogenaza 6) se află în același grup de *linkage* ($6,5\%$ recombinare), precum și cu caracterul morfologic fc (Fc – conținutul clorofilei în frunza flag) (Est 5 - Pgd 1 - fc). Altă grupă de *linkage* este stabilită pe brațul lung al cromozomului 7 determinată de fs-s-r-Est 9 [466].

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.

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

Regenerarea *in vitro* include nu doar inițierea și proliferarea celulară, ci și cito- și histodiferențierea urmate de formarea structurilor morfogene. Conform datelor mai multor cercetători capacitatea de regenerare este controlată genetic, însumând interacțiunea factorilor genetici nucleari și citoplasmatici [389]. Factorii de bază ce induc variabilitatea somaclonală sunt de natură genetică și epigenetică, precum și condițiile, durata cultivării explantului constituie determinanți ai diversității, având influență semnificativă [346; 445; 473]. Orice inductor genetic (aneuploidiiile, poliploidiiile, rearanjamentele structurale ale ADN-ului) poate genera variante somaclonale apte de a se transmite ereditar [305; 346]. Se consideră, că variabilitatea genetică poate fi generată de eterogenitatea explantului, componenții mediilor de cultură și lipsa controlului genetic la nivel de organism integru.

Regeneranții obținuți prin culturi *in vitro* se pot deosebi de formele inițiale printr-o serie de caractere. Această variabilitate, numită somaclonală [250], este aptă să atingă cele mai diverse însușiri ale plantei (productivitatea, rezistența sau toleranța față de factori biotici sau abiotici ai mediului), reprezentând astfel o sursă importantă de forme cu noi caractere.

Prin aplicarea culturii *in vitro* au fost obținute forme de grâu și sorg cu productivitate sporită [56; 285; 450], conținut majorat de proteine [357] și ulei [337], precocitate și rezistență înaltă la patogeni [56].

Un deosebit interes prezintă extinderea studiului asupra diverselor aspecte ale patogenezei virale la nivel de culturi de țesuturi pentru sisteme cu strategii specifice de interacțiune precum virusul mozaicului conopidei. VMCo, utilizează revers-transcriptaza pentru replicarea genomului și asigurarea ciclurilor vitale [188]. Pentru VMCo este descrisă o omologie cu domeniile proteazice și polimerazice ale transcriptului 79 kDa ale retrovirusului coriomeninghitei limfocitare, virusului hepatitei B [403], agenți ce influențează proliferarea celulară, declanșând tumorogeneza și care sunt capabili să se integreze în genomul gazdei. Activitatea revers-transcriptazei VMCo variază în diferite sisteme genotip-gazdă [366]. Astfel, un nivel mai înalt a fost stabilit la formele cu o sensibilitate înaltă (de ex. la sp. *Brassica rapa*), prezentând o dependență organospecifică. În condiții experimentale promotorul transcriptului 35S al VMCo este folosit cu succes în transgeneza unor secvențe genice [341].

6.3.1. Calusogeneza și capacitatea regenerativă a explantelor de varză sub influența virusului mozaicului conopidei

Din cercetările citomorfologice s-a stabilit, că VMCo induce la plantele gazdă un spectru variat de modificări, inclusiv malformații, terate, rareori tumori nervuriene sau radiculare. Deseori, în sistemele create între VMCo și genotipurile cu sensibilitate înaltă se remarcă formarea enațiilor, ca rezultat al declanșării proceselor proliferative în celulele deja diferențiate.

Pentru evaluarea impactului infecției virale asupra proliferărilor celulare am utilizat cultura de țesuturi. Din literatura de specialitate este bine cunoscut caracterul eterogen al reorganizărilor structurale induse de virusuri la nivel celular și tisular. În acest context, un interes deosebit prezintă studierea calusogenei la plantele gazdă pentru diferite sisteme citopatice, cu evidențierea particularităților specifice tipului explantului (țesuturi cu diferit grad al malformațiilor).

În scopul inducerii culturii de țesuturi au fost folosite explante de mezofil ale plantelor gazdă de varză albă (*Brassica oleracea* var. *capitata*), conopidă (*B. oleracea* var. *botrytis*). Inițial au fost experimentate opt variante de adausuri de vitamine și hormoni la mediul

Murashige Skoog (1962). Conform rezultatelor testului Anova, mediul nutritiv deține o putere de influență de 12,46%. Impactul infecției virale asupra capacității de calusogeneză este major față de genotip și mediul de cultură [15].

Tabelul 6.5. Analiza varianței pentru capacitatea de calusogeneză la soiurile de varză

Sursa de variație	Contribuția în sursele de variație	Suma pătratelor	GL	Pătratul mediu	F	P
Genotipul	9,43	0,048954	2	0,024471	2,97	0,1269
Virusul	31,91%	0,048961	1	0,048961	5,97	0,0506
Mediul	12,46%	0,315302	7	0,157651	19,13	0,0025

Mai optim pentru inițierea și proliferarea calusală s-a dovedit a fi cel cu adaos de BAP (0,5 mg/l), ANA (0,5 mg/l), chinetină (0,01 mg/l), sucroză (2%), agar (0,7%). Pe mediul respectiv, la a 7-9 zi după inoculare se observau inițieri de calus. La 2-2,5 luni se efectuau pasaje, iar în rezultatul a 4-5 pasaje se obțineau primii regeneranți (Figura 6.7).

Analiza calusogenezei pentru diferite sisteme citopatice (țesuturi ale mezofilului nemodificate macrostructural, cu malformații și asociate malformațiilor) a stabilit un grad deosebit de proliferare celulară în condiții *in vitro*. Capacitatea de proliferare la cele trei genotipuri de varză cu reacție de sensibilitate sistemică la infectarea cu VMCo a permis de a constata reducerea frecvenței calusogenezei de la 17 până la 55% pentru explantele din țesuturi macrostructural nemodificate ale genotipurilor infectate.

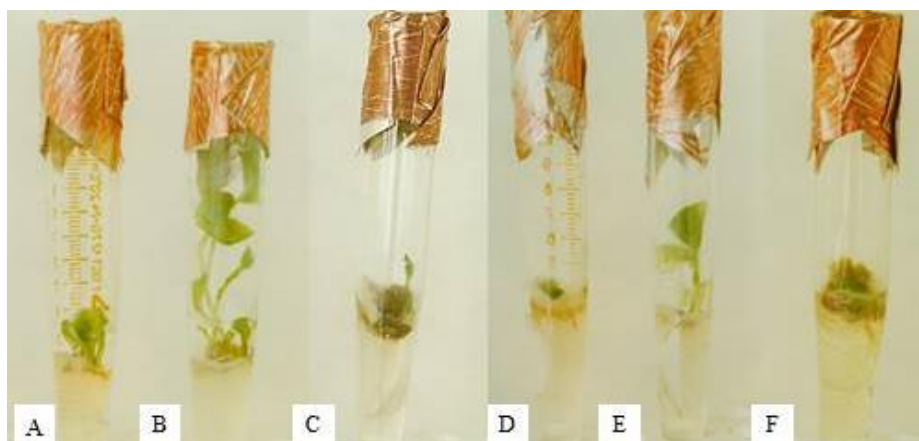


Fig. 6.7. Capacitatea regenerativă și regeneranți de varză obținuți din diferite sisteme citopatice a s. Haricovscaia (A, B, C) și s. Podaroc (D, E, F): A, D – țesuturi nemodificate macrostructural, B, C – țesuturi malformate, E, F – țesuturi adiacente malformațiilor.

Cel mai redus nivel al calusogenezei a fost stabilit pentru zonele învecinate malformațiilor, calusogeneza fiind redusă cu 45 – 70% comparativ cu martorul sănătos (Tabelul

6.6). Frecvența calusogenezei în țesuturile malformate la cele trei genotipuri analizate s-a dovedit a fi aproximativ la nivelul valorii variantei martor sau chiar mai ridicată față de martor (cu 73%).

Tabelul 6.6. Influența virusului mozaicului conopidei asupra capacității de calusogeneză a diferitelor zone citopatice la unele soiuri de varză

Genotip Variantă		<i>B. oleracea</i> 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
VMCo	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 învecinate malformațiilor	16,7±4,1***	27,3±5,2***	25,4±3,2***

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

Din datele privitor la aportul fiecărui din acești trei factori: genotip-virus-explant asupra capacității de calusogeneză se remarcă deținerea unui control dominant al explantului, celelalte două componente având o putere de influență practic similară (Tabelul 6.7).

Tabelul 6.7. Analiza varianței pentru capacitatea de calusogeneză la unele soiuri de varză în dependență de zona citopatică

Sursă de variație	Contribuția în sursa de variație (%)	Suma pătratelor	GL	Pătratul mediu	F	P
Genotip	10,98	0,048954	2	0,024477	2,97	0,1269
Virus	10,98	0,048961	1	0,048961	5,97	0,0506
Explant	70,73	0,315302	2	0,157651	19,13	0,0025

Studiul proliferărilor în 12 sisteme *in vitro* create în baza a 3 genotipuri la infectarea cu VMCo a scos în evidență:

- frecvența calusogenezei în țesuturile macrostructural nemodificate ale genotipurilor infectate scade, cu un nivel de diminuare de la 17 până la 55% în dependență de genotip;
- capacitatea proliferativă în țesuturile învecinate malformațiilor este foarte redusă, calusogeneza, atingând în unele cazuri practic cota zero;
- rata de inducere a calusului în țesuturile malformate este aproximativ la nivelul valorii variantei martor sau chiar mai ridicată. Aceste sisteme citopatice au prezentat o rată majoră și a regenerării.

Ținând cont de contribuția tipului de explant asupra capacității regenerative în evaluarea influenței VMCo au fost utilizate doar țesuturi malformate ce au prezentat un nivel mai înalt proliferativ la soiuri cu un diferit grad de expresie a procesului de patogeneză (Tabelul 6.8).

Tabelul 6.8. Frecvența calusogenezei și regenerării *in vitro* la unele soiuri de varză infectate cu virusul mozaicului conopidei

Genotip	Variantă experimentală	Frecvența calusogenezei	Frecvența regenerării
s. Haricovscaia	Martor	56,55±6,27	64,17±5,20
	VMCo	46,51±3,57*	28,97±4,18**
s. Moldavanca	Martor	45,21±4,46	65,48±13,52
	VMCo	29,72±3,19**	55,56±9,62
s. Iuniscaia	Martor	91,03±4,07	53,26±9,19
	VMCo	70,38±2,18***	25,18±17,59
s. Slava	Martor	84,73±5,17	35,18±13,17
	VMCo	54,69±9,28**	36,67±20,21
s. Podaroc	Martor	78,26±5,68	23,74±7,26
	VMCo	15,28±6,05***	33,33±6,23
s. Conopida	Martor	49,47±6,37	44,44±13,88
	VMCo	22,01±1,91***	35,00±8,88

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

Analiza capacității de calusare la genotipurile analizate a permis de a constata, că infecția virală contribuie la reducerea frecvenței calusogenezei în medie cu 41% față de martor. Cea mai puternică influență represivă a infecției virale a fost stabilită pentru s. Podaroc (frecvența calusogenezei a fost micșorată cu 80%, $P < 0,001$). Un impact mai lejer, dar statistic confirmat, a fost remarcat pentru s. Haricovscaia (frecvența calusogenezei a fost redusă cu 18%, $P < 0,05$). Este important de menționat, că doar pentru soiul dat a fost stabilită reducerea semnificativă a frecvenței regenerării, care a fost micșorată cu 55% ($P < 0,01$). Pentru s. Podaroc a fost constatată o tendință de creștere a capacității regenerative a calusurilor derivate de la plantele infectate, comparativ cu martorul.

Aplicarea testului ANOVA a permis de a evalua contribuția procentuală a genotipului gazdei și a infecției virale asupra capacității de calusogeneză sau regenerare (Tabelul 6.9).

Cercetările efectuate în baza fitopatosistemelor genotipurilor cu grad diferit de sensibilitate au pus în evidență influența prioritară a genotipului gazdei (peste 50%). S-a constatat, că infecția virală reprezintă o sursă de variație mai puternică pentru calusogeneză, deținând o putere de influență de 35% comparativ cu 18% pentru regenerare. Variația

calusogenezei și a regenerării în dependență de genotip este practic la același nivel, variind în jurul valorii de 50%.

Tabelul 6.9. Analiza varianței pentru capacitatea de calusogeneză și regenerare la unele soiuri de varză

Sursă de variație	Contribuția în sursa de variație (%)	Grad de libertate	Suma pătratelor	S ²	Testul F	P
Varianța frecvenței calusogenezei						
Virus	35,91	1	2314,3	2314,3	13,14	0,0151
Genotip	50,42	5	3249,13	649,82	3,69	0,0891
Efect rezidual		5	880,62	176,12		
Total		11	6444,04			
Varianța frecvenței regenerării						
Virus	18,21	1	426,82	426,81	2,93	0,1475
Genotip	50,73	5	1188,82	237,76	1,63	0,3017
Efect rezidual		5	727,95	1445,57		
Total		11	2343,49			

Prin aplicarea analizei varianței, în studiul dat a fost confirmat impactul infecției virale produs de VMCo asupra variabilității somaclonale; puterea de influență a agentului patogen fiind specifică genotipului.

După excizare și inoculare pe medii nutritive de cultură explantul pierde relațiile ergastice, morfologice, dar nu și cele genetice. Noile condiții induc semnale care direcționează dezvoltarea de mai departe în condiții *in vitro* (calusogeneză, organogeneză, moarte celulară) asigurate de programe genetice strict coordonate și consecutive, fiind dependente de efectul combinat a mai multor factori. În cazul infectării plantelor cu virusuri, între genomurile acestora pe parcursul patogenezei se stabilesc interrelații în dependență de tipul reacției gazdei față de acest patogen (susceptibilitate, toleranță sau rezistență). Pătrunderea particulelor virale și declanșarea procesului patologic condiționează semnale inductoare ale reacțiilor de răspuns ce au la bază procese biochimice, care în cazul infecțiilor proliferative cuprind cele mai diverse aspecte fiziologice și biochimice [83]. În celule diferențiate, specializate, precum cele ale șesuturilor mezofilului, în urma factorilor de semnalare, metabolismul celular este redirecționat și indusă dediferențierea. Realizarea acestor evenimente este asigurată de programe genetice strict coordonate și consecutive, dependente de efectul combinat al mai mulți factori.

6.3.2. Evaluarea diversității induse de virusul mozaicului conopidei la varză prin analize electroforetice

Pornind de la realizările biochimiei și geneticii moleculare, aprecierea variabilității genetice a formelor se poate realiza eficient cu ajutorul markerilor proteici. Datele din literatură privitor la eficacitatea folosirii spectrelor izoenzimatică ca markeri biochimici, indică valoarea markerilor proteici în aprecierea variabilității la cele mai diverse culturi [174]. Леркобит М., Хадеева Н. [474] au stabilit pentru peroxidaze o înaltă specificitate organică și tisulară la genul *Stachys*.

Este cunoscut, că în calitate de marcheri proteici pot fi folosite proteinele genetic polimorfe. Peroxidaza este un ferment polifuncțional cu un înalt grad de polimorfism [467]. Numărul izoformelor poate varia de la 3-10 până la câteva zeci. Peroxidaza îndeplinește un spectru vast de funcții, participând în procesele de oxidare, lignificare a membranelor celulare, procesul fotosintetic, respirator, de reglare a proceselor de creștere, realizarea cărora necesită o cantitate esențială de energie, principala fiind detoxifierea celulelor. Conform mai multor relatări în diverse condiții, inclusiv patologice, peroxidaza poate varia cantitativ și calitativ [443; 467]. Граскова И. și coaut. [457] remarcă intensificarea activității peroxidazei în celulele de cartof infectate cu fungi în dependență de reacția gazdei față de patogen, astfel încât la soiul rezistent activitatea fermentului crește mai semnificativ comparativ cu cel sensibil. Această constatare se referă atât pentru peroxidaza citoplasmatică, cât și pentru la cea membranară. Rezultate similare au fost constatate la plantele de *B. oleracea* var. *capitata* rezistente la *Xanthomonas campestris* care prezintă o activitate sporită a peroxidazei la formele susceptibile [150]. De asemenea au fost remarcate și deosebiri calitative, specifice formelor rezistente exprimate prin caracterul anionic al izoenzimelor [212].

Rezultatele analizei electroforetice ale peroxidazei reflectă un polimorfism sporit al enzimei date în țesutul vegetativ al plantelor de varză reprezentat la variantele martor prin 6 - 9 zone cu diferită mobilitate electroforetică (Figura 6.8). În țesutul plantelor martor s-au atestat 1-2 izoforme cu mobilitate redusă, 3-4 medie și 2-4 mare, numărul de componente variind în dependență de genotip. Cel mai major număr de izoenzyme a fost remarcat pentru calusul regenerativ de conopidă.

Izoformele cu mobilitate mică depistate la martor au fost identificate și în țesutul calusal al plantelor infectate cu VMCo. Variația tipului de izoperoxidaze s-a stabilit în special pentru formele cu mobilitate medie și mare. Unele din izoforme (rf 0,176-0,190) au fost descrise numai la variantele cu utilizare a infecției virale. Totodată, în calusul regenerativ al ambelor soiuri de varză albă infectate cu VMCo s-a remarcat absența izoperoxidazelor cu mobilitate medie (rf

0,595-0,640). În țesut calusal derivat din zonele învecinate malformațiilor a fost atestat cel mai înalt număr de izoenzime, dar și o intensitate majoră a benzilor, dovedind o activitate mai sporită a peroxidazelor. Astfel, electroforegramele denotă deosebiri calitative, precum și cantitative pentru calusurile derivate din diferite tipuri de explante și care dețin un potențial regenerativ variat.

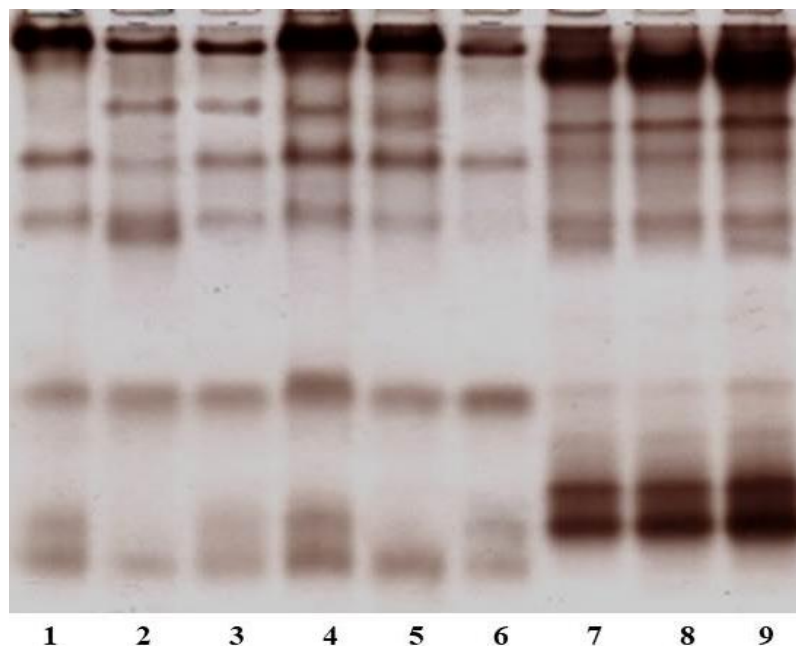


Fig. 6.8. Spectrul peroxidazelor în explantele de diferită origine ale soiurilor de varză: Haricovscaia (1, 2, 3), Podaroc (4, 5, 6) și conopidă (7, 8, 9): 1, 4, 7 – martor, 2, 5, 8 – calus regenerativ din țesuturi malformate și 3, 6, 9 – adiacente malformațiilor.

Хавкин Э., Забродила М. [488] remarcă modificări cantitative și calitative în spectrul peroxidazelor și esterazelor la regeneranții de porumb obținuți prin culturi *in vitro* comparativ cu formele inițiale, exprimate prin apariția în frunze a unor benzi noi ale izoperoxidazei specifice rădăcinilor, precum și la esterază, însoțite de majorarea activității ambilor fermenți. De asemenea, este stabilită moștenirea remanierilor izoformelor peroxidazice pe parcursul a două generații consolidate prin autopolenizare.

Se consideră, că intensificarea activității fermentului poate fi rezultatul activării fermentului în celulă, precum și sintezei *de novo* a unei noi cantități de enzimă [218]. Majorarea numărului de izoforme cu aceeași mobilitate după Хавкин Э., Забродила М. [488] poate fi explicată drept rezultat al unor restructurări cromozomale, mutații ce derivă din instabilitățile procesului de mitoză în celulele calusale și care pot fi transmise generațiilor următoare.

6.3.3. Variabilitatea parametrilor morfometrici ai somaclonelor de varză obținute din explante infectare cu virusul mozaicului conopidei

În cercetare au fost incluși regeneranții obținuți de la s. Haricovscaia, s. Amagher, s. Moldavanca, s. Zavadovscaia care au supraviețuit la adaptarea *ex vitro* în substrat sol. Somaclonele capatate au fost testate cu privire la prezența germenilor virali prin metoda imunosorbentă (ELISA) și contrastării negative. Reacția față de VMCo a fost studiată pentru regeneranții obținuți atât de la plantele martor, cât și de la cele infectate. Este important de menționat, că unii regeneranți purtau simptome ale virozei exprimate nu doar prin pete mozaice, dar și prin deformări ale limbului. Prezența virionilor virali la regeneranții menționați a fost confirmată prin procedeul contrastării negative. Cota somaclonelor infectate cu simptome externe a constituit 13,3%, iar germenii virali au fost recunoscuți la 30% din regeneranți.

Pentru aprecierea variabilității somaclonale au fost evaluați parametrii morfologici ai regeneranților în baza dimensiunilor frunzei (lățimea, lungimea, precum și coraportul acestor doi indici), numărul de frunzulițe, lungimea rădăcinii, tulpinii, conținutul de substanțe uscate (Figurile 6.9 – 6.11).

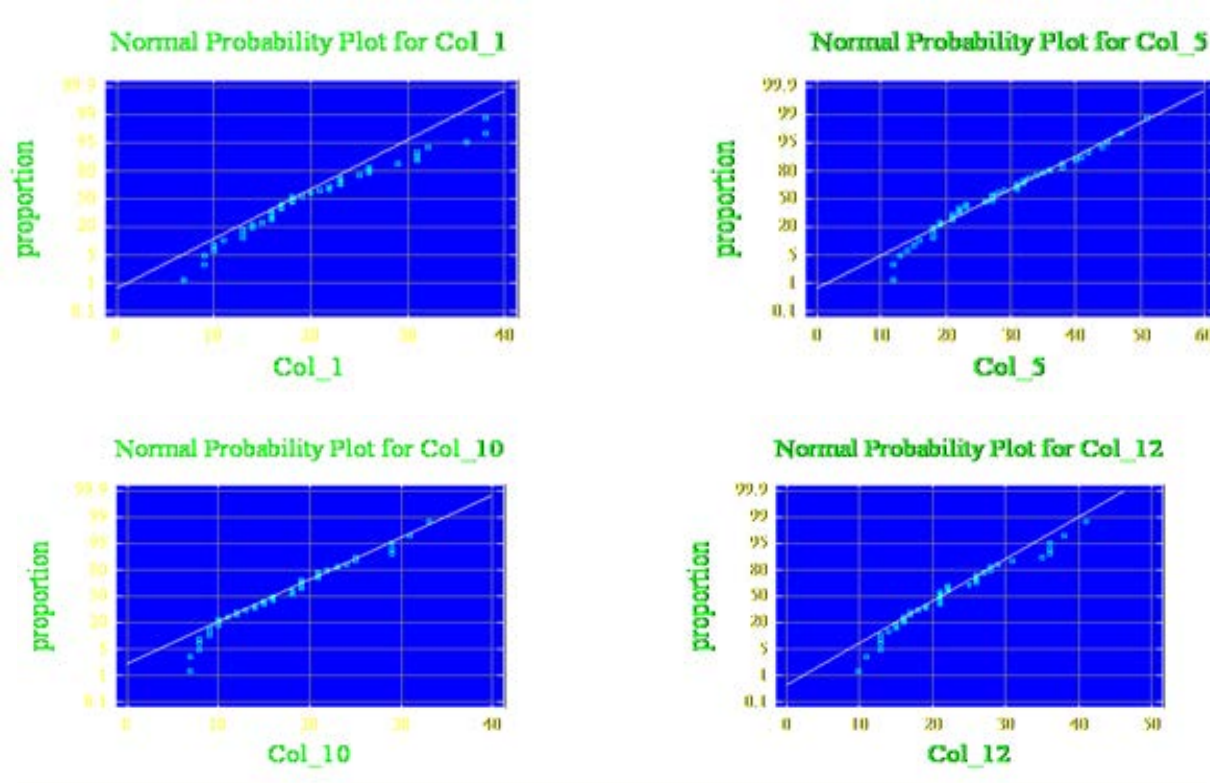


Fig. 6.9. Distribuția frunzulițelor s. Haricovscaia după lățime și lungime la regeneranții martor și cei derivați din explante infectate cu virus (Col 1, 10 – martor, Col 5, 12 – virus; Col 1, 5 – lățimea, Col 10, 12 – lungimea unei frunzulițe).

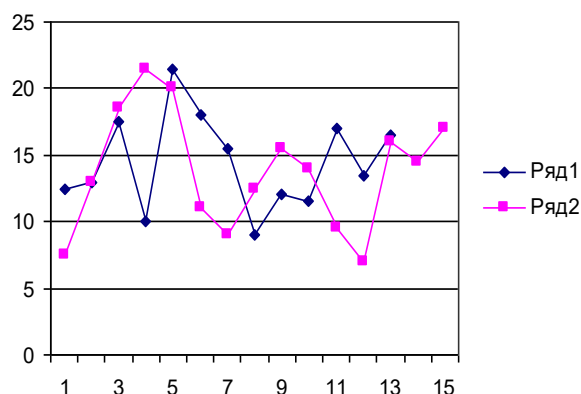


Fig. 6.10. Coraportul lățime/lungime a frunzulițelor somaclonelor de varză: 1 – martor, 2 – virus.

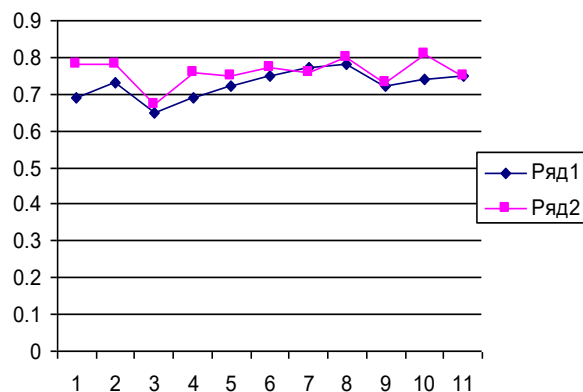


Fig. 6.11. Variația lungimii rădăcinii principale la regeneranții obținuți *in vitro*: 1 – martor, 2 – virus.

Variația valorilor indicilor morfologici a regeneranților au avut aceeași tendință la ambele variante. Între variația parametrilor frunzei, lungimii rădăcinii somaclonelor variantei martor și celei experimentale se atestă o similitudine. Deosebiri esențiale au fost atestate după coraportul lățime/lungime a frunzulițelor. Cu toate, că cultura *in vitro* generează o variabilitate extinsă în ambele variante experimentale, între valorile medii nu au fost constatate deosebiri statistic confirmate (Tabelul 6.10).

Tabelul 6.10. Valoarea unor caractere morfologice la regeneranții de varză obținuți prin culturi *in vitro*

Indici morfologici	s. Amagher		s. Moldavanca		s. Haricovscaia	
	Martor	Experiență	Martor	Experiență	Martor	Experiență
Lungimea frunzuliței (mm)	37,73±2,04	29,91±2,23	38,36±2,02	30,36±2,09	37,54±2,08	32,09±2,03
Lățimea frunzuliței (mm)	29,64±1,77	24,45±1,59	29,82±1,59	24,09±1,55	28,81±1,63	24,82±1,45
Coraportul lățime/lungime	0,78±0,02	0,83±0,01	0,78±0,02	0,80±0,24	0,77±0,03	0,78±0,02
Frunzulițe per regenerant (număr)	4,09±0,25	4,18±0,23	4,27±0,195	4,45±0,25	4,36±0,27	4,819±0,33
Lungimea rădăcinii principale (mm)	14,32±1,16	13,81±1,39	14,77±1,15	13,82±1,40	14,65±1,14	14,03±1,40
Lungimea tulpiniței (mm)	1,93±0,14	2,67±0,19***	1,98±0,13	2,64±0,19***	1,98±0,15	2,65±0,19***
Conținutul substanțelor uscate	12,02±0,81	13,93±1,77	11,99±0,76	14,10±2,24	12,26±0,47	13,97±1,84

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

Din 6 caractere analizate doar pentru lungimea tulpiniței au fost relevate deosebiri statistice. Astfel, plantulele regenerare din țesut infectat dețineau o tulpină cu 45,59% mai lungă față de cele derivate din țesut sănătos.

Variabilitatea caracterelor studiate a fost specifică, având primordial un determinism genotipic (Tabelul 6.11).

Tabelul 6.11. Coeficientul de variație a unor caractere cantitative la regeneranții de varză obținuți din histopatosisteme ale mezofilului

Indici morfologici	s. Amagher		s. Moldavanca		s. Haricovscaia	
	Martor	Experiență	Martor	Experiență	Martor	Experiență
Lungimea frunzuliței (mm)	45,818	54,891	44,654	48,254	47,673	45,291
Lățimea frunzuliței (mm)	34,655	27,873	27,764	26,491	29,164	23,163
Coraportul lățime/lungime	0,006	0,004	0,005	0,006	0,012	0,006
Frunzulițe per regenerant	0,691	0,564	0,418	0,673	0,855	1,163
Lungimea rădăcinii principale	14,914	21,41	14,560	21,655	14,301	21,446
Lungimea tulpiniței	0,224	0,428	0,181	0,403	0,234	0,423
Conținutul substanțelor uscate	0,661	3,12	0,586	5,038	0,221	3,291

Deși variabilitatea în cadrul variantei a fost pronunțată, abaterile individuale cauzate de VMCo au avut pentru anumite caractere suport statistic, puterea de influență a parametrului constituind cca 50% (Tabelul 6.12).

Tabelul 6.12. Analiza varianței pentru unele caractere morfologice studiate la regeneranții de varză albă obținuți prin tehnici *in vitro*

Sursă de variație	Contribuția în sursa de variație (%)	Grad de libertate	Suma pătratelor	S ²	Testul F	P
Virus	2,59	626,45	1	626,452	11,66	0,0008
Genotip	6,07	1468,27	2	146,827	2,73	0,0000
Indice morfologic	46,16	11156,2	6	146,827	2,73	0,0036
Efecte reziduale		11018,3	205	53,748		
Total		24169,5	219			

Un alt caracter pentru care au fost înregistrate devieri statistice semnificative este conținutul de substanțe uscate. Astfel, dacă la martor conținutul de substanțe uscate a constituit 12,0-12,3%, la regeneranții plantelor infectate a atins 13,9-14,1%. Conform distribuției coeficientului de variație se remarcă modificări semnificative, fiind atestați indivizi cu un conținut de substanțe uscate de peste 17-18% mai sporit decât cele mai superioare valori.

Aceste rezultate au fundamentat reperele procedului de sporire a variabilității somaclonale la varză [6]. Conform invenției propuse, infecția virală eficientizează cultura *in vitro* a țesuturilor în vederea sporirii variațiilor somaclonale pentru același genotip și tip de explant. Astfel, regenerarea plantulelor de varză din explantele de țesut mezofilian al plantelor infectate cu VMCo asigură obținerea formelor cu caractere valoroase deosebite de genotipului inițial.

Concluzii la Capitolul 6

1. Plantele de tomate și orz infectate cu virusuri și descendenții obținuți din condiții patologice prezintă modificări în manifestarea unor caractere cantitative și calitative, cu expresie specifică fiecărei combinații gazdă-patogen.

2. Analiza variației caracterelor valoroase la plantele de tomate infectate cu VAT a scos în evidență devieri semnificative de la martor pentru *talia plantei, lăstari laterali roditori, ciorchine cu fructe per plantă, fructe per ciorchină și plantă, masa unui fruct, semințe per fruct, parametrii biochimici ai fructelor*, fiind stabilite particularitățile specifice fiecărui genotip.

3. În rezultatul cercetării influenței VMDO asupra manifestării caracterelor cantitative (*talia plantei, lungimea spicului principal, lungimea ultimului internod, numărul de boabe per spic, numărul fraților fertili per plantă și numărul internodurilor*) s-a constatat variația semnificativă a coeficienților de variație a caracterelor studiate la plantele supuse acțiunii infecției virale.

4. VAT și VMDO au modificat variabilitatea caracterelor cantitative la descendenții plantelor infectate, în comparație cu martorul, influențând amplitudinea acestora în dependență de genotip, generație și indicele biomorfologic. Virusurile analizate reprezintă pentru plantele gazdă o sursă semnificativă de variație, puterea de influență a cărora depinde de particularitățile genotipului. Acest fapt relevă posibilitatea utilizării infecției virale în calitate de inductor al diversității și variabilității genotipice la plante.

5. În baza evaluării spectrelor electroforetice ale proteinelor de rezervă au fost apreciate profilurile hordeinelor tipice fiecărui soi de orz analizat și evidențiate devieri cantitative și calitative ale fracțiilor polipeptidice specifice fiecărei variante experimentale. Diferențele

calitative, confirmate prin analizele densitogramelor și identificate în spectrele electroforetice ale hordeinelor confirmă inducerea de către VMDO separat sau în asociere cu razele gama a unui polimorfism biotipic în dependență de specificul genotipului.

6. Variațiile calitative constatate în spectrele electroforetice ale peroxidazelor și esterazelor confirmă generarea de către VMDO a unui polimorfism al izoenzimelor implicate în asigurarea adaptabilității genotipurilor, ceea ce indică posibilitatea obținerii de forme cu noi combinații de însușiri.

7. Evaluarea variabilității indusă de virusul mozaicului conopidei la somaclonale soirilor de varză albă (Iuniscaia, Podaroc, Harcovscaia, Moldavanca, Amager, Zavadvovscaia, Slava) și conopidă a stabilit, că contribuția infecției virale asupra modificării frecvenței calusogenezei constituie cca 35% și cca 18% – asupra capacității regenerative. Tipul explantului reprezintă o sursă majoră pentru variația calusogenezei cu o contribuție de 70%.

8. Aprecierea variabilității somaclonale în baza unor indici morfologici (*dimensiunile frunzei – lățimea, lungimea, raportul lățime/lungime a frunzei, numărul de frunzulițe, lungimea rădăcinii, tulpinii*) a pus în evidență deosebiri statistice doar pentru *lungimea tulpinii*, precum și a *conținutului de substanțe uscate*. Analiza varianței a demonstrat puterea de influență primordială pentru caracter la nivel de 60%.

9. Rezultatele experimentale, confirmate în baza analizei varianței, denotă impactul infecției virale asupra proliferării celulare în condiții *in vitro* modulată de tipul explantului și genotipul gazdei.

SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE

Pentru înțelegerea mecanismelor moleculare de interacțiune a virusurilor cu plantele gazdă este importantă cunoașterea reorganizărilor spațio-temporale. Identificarea localizării particulelor virale la nivel subcelular permite descrierea strategiilor necesare care duc la stabilirea infecțiilor productive. Specificitatea reacției plantei este determinată de constituenții necesari pentru replicarea și distribuirea virionilor prin cooperare cu factorii defensivi ai plantei gazdă.

În dependență de reacția față de virusuri, plantele pot prezenta rezistență sau sensibilitate (toleranță, susceptibilitate). După pătrunderea în celulele vegetale ale sistemelor sensibile virusurile se deplasează de la celulă la celulă prin plasmodesme ca complexe ribonucleoproteice virale (vRNP). Proteinele codate de virus, cum ar fi replicaza (Rep), proteina de înveliș (PÎ, *coat protein*) și proteina de deplasare (PD, *movement protein*) sunt traduse în celula gazdă și funcționează în mod cooperant în procesele de translație, replicare, încapsidare și propagare a virusului, fiind suplimentate de modificări ale metabolismului celular. Orice infecție virală este complementată de reacții nespecifice și specifice, acestea din urmă dovedind polivalența procesului și necesitatea studiului individualizat.

Cercetările noastre au inclus patosisteme create în baza virusurilor ARNmc (+), ADN dc și speciile gazdă. Din grupul patogenilor ARNmc fac parte VMT, VAT, VXC, precum și VMDO cu genom tripartit, iar a virusurilor ADN dc – VMCo, agenți cu strategii de replicare diferită. Este cunoscut, că replicarea virusurilor ARNmc (+) se realizează în citosol și include (i) deproteinizarea și expunerea acidului nucleic proceselor de replicare; (ii) traducerea ARN viral, în timp ce acidul nucleic servește ca ARN de mesaj pentru sinteza proteinelor structurale și non-structurale. Acest proces este în continuare împărțit în translația timpurie a proteinelor necesare pentru replicare (de ex. RdRp) și translația secundară sau târzie a proteinelor cu alte funcții (de ex. proteina de înveliș). Replicarea genomului (iii) care produce molecule de ARN ale genomului viral are loc în două etape, ambele catalizate de RdRp: (1) sinteza unei molecule complete (negative) complementare a ARN genomic (pozitiv) utilizat ca matriță; (2) sinteza ARN genomic și ARN-lor subgenomice, folosind ARN negativ. La etapa finală (iv) descendentele genomice sunt încapsulate (Figura 7.1). *Site-uri* pentru replicarea unor asemenea virusuri sunt citosolul, dar și unele organite celulare, precum mitocondriile, cloroplastele, formațiunile membranare. Incluziunile citoplasmatică sunt invocate, de asemenea, ca locație pentru replicarea ARN-ului viral [402].

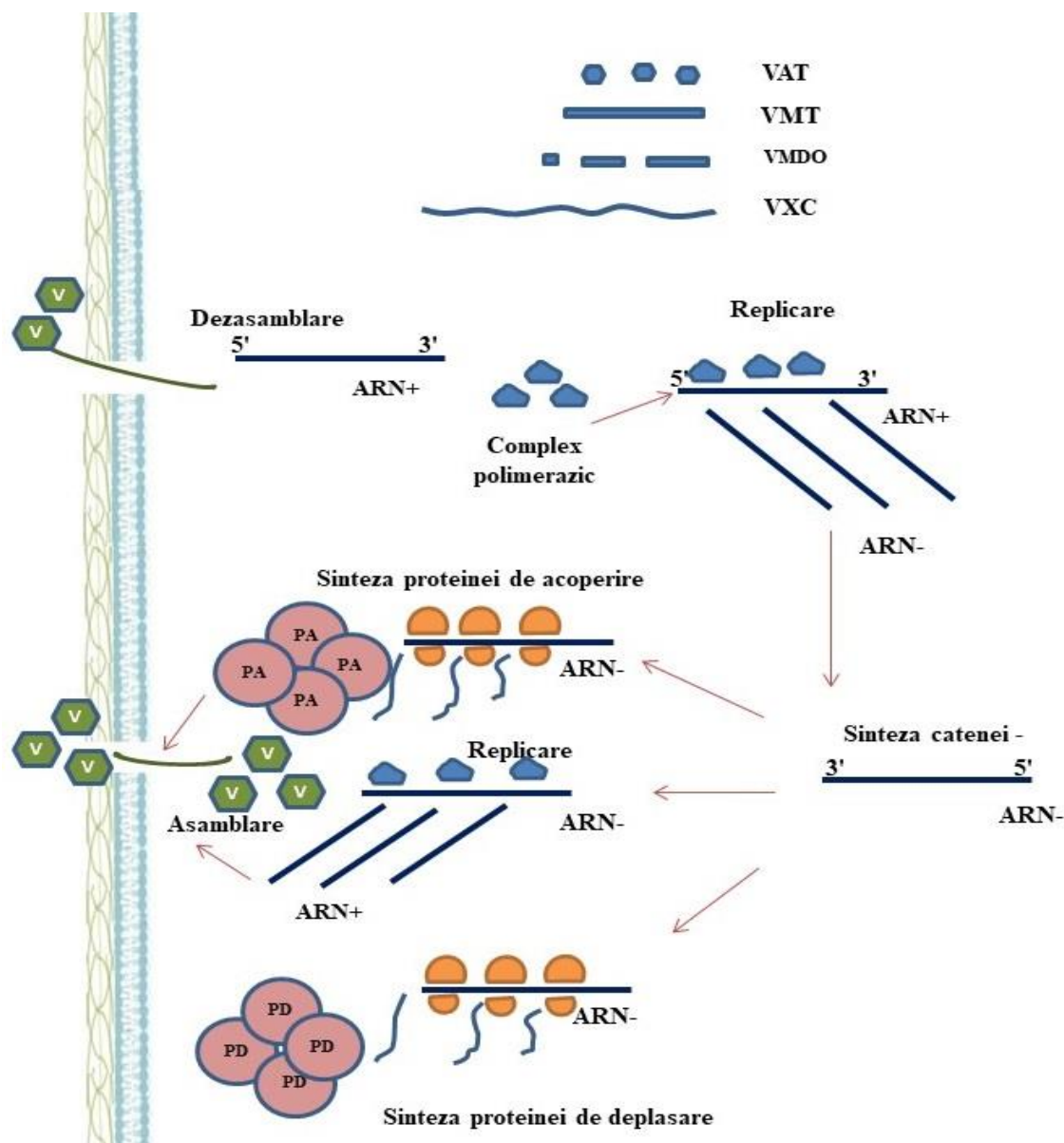


Fig. 7.1. Schema replicării ARN-ului viral de tip (+) (originală).

Unele virusuri, inclusiv VMCo, pentru replicarea lor depind de proteinele nucleare ale gazdei. Sunt descrise diverse complexe proteice, cum ar fi Vpr, integrează, care conțin semnalul de localizare nucleară (NLS) în genomul virusurilor ce le asigură penetrarea în interiorul nucleelor. Aceste NLS interacționează cu receptorii de transport nuclear și permit transportarea proteinelor virale prin complexul poral. Nucleoproteina virală conține NLS1, NLS2 și NLS3, care ajută la legarea vRNP la importinele celulare și tranzitarea prin pori în interiorul nucleului [158].

Spre deosebire de virusurile ARN componente, ciclul replicativ al VMCo (virus ADNdc) demarează cu etapa nucleară, în timpul căreia ADN viral este transcris de către ARN-polimeraza II ADN dependentă a gazdei cu formarea a 2 transcripti (19S și 35S). Cea de-a II etapă se

produce în citoplasmă și rezultă în translarea ARN 19S cu sinteza proteinei 62kDa, în timp ce molecula 35S este transcrisă de ADN-polimeraza dependentă de ARN (revers-transcriptază) cu formarea de ADN-uri virale.

Deși virusurile ADN și ARN interacționează diferit cu structurile nucleare, ambele tipuri de agenți induc modificări ce stabilesc controlul asupra transcripției celulare și favorizării transcripției genomului propriu față de cel al gazdei.

Efectele nucleopatice de poziție, remarcate de noi în celulele calusale ale diferitelor soiuri de varză infectate cu VMCo s-au exprimat prin reconfirmări ale cromatinei, în deosebi ale celei perimembranare. Conform constatărilor strabibile, volumul relativ al heterocromatinei distribuite atașat membranei nucleare a sporit cu 37,5 – 56 % în sistemele citopatice în dependență de soi. Este cunoscut, că sporirea zonelor de heterocromatină este o reflectare a diminuării proceselor de transcripție și, în ansamblu, a activității nucleului. Se consideră că schimbările conformaționale ale cromatinei derivă din gradul de metilare a ADN-ului și sunt urmate de modificări ale activității lor transcripționale [73]. Restructurările constatate în gradul de compactizare al cromatinei în sistemele varză-VMCo au fost asociate cu un nivel proliferativ diferențiat, dependent prioritar de tipul explantului. Analiza calusogenezei pentru sisteme citopatice cu diferit grad de modificări macrostructurale (țesuturi mezofilane nemodificate, cu malformații și învecinate malformațiilor) a stabilit un nivel deosebit de proliferare celulară în condiții *in vitro*. Genotipurile de varză cu sensibilitate sistemică la infectarea cu VMCo au prezentat o capacitate proliferativă pentru țesuturile macrostructural nemodificate cu o frecvență mai redusă (de la 17 până la 55% față de țesuturile sănătoase și cu 45 – 70% pentru țesuturile zonelor adiacente malformațiilor), în timp ce frecvența calusogenezei în țesuturile malformate s-a dovedit a fi aproximativ la nivelul valorii variantei martor. Această eterogenitate tisulară ne permite să concluzionăm despre o susceptibilitate diferențiată la nivel de celulă, confirmată și prin analizele ultrastructurale ale celulelor țesuturilor mezofilului, endoteciului și ale stratului tapetal la tomate și orz. Drept argument pentru fundamentarea deducției date servesc înregistrările cu privire la localizarea specifică a particulelor virale și incluziunilor induse în unele celule și absența acestora în altele în cadrul aceluiași țesut.

În sistemele citopatice provocate de virusurile ARN și ADN a fost stabilită o eterogenitate a gradului de expresie a modificărilor la nivelul organelor celulare. Gradul de reorganizare a fost mai accentuat la genotipurile cu susceptibilitate comparativ cu varietățile spontane, având un spectru similar al restrukturărilor (Tabelul 7.1). Genotipurile tolerante s-au distins prin sporirea numărului de peroxizomi, menținerea integrității organelor sistemului energetic (mitocondriilor și plastidelor), dar și deținerea unui număr mai major de microspori cu

structură normală. Majorarea numărului de peroxizomi, organite legate de procesele de β oxidare a acizilor grași și metabolismul SRO, este o reacție nespecifică a plantelor ca răspuns la factorii de stres, eveniment care se produce ca urmare a formării de noi organite de la reticulul endoplasmatic, sau prin divizarea organitelor preexistente [158].

Tabelul 7.1. Reorganizări intracelulare induse de infecțiile virale în dependență de specificul tisular al sistemului gazdă-patogen

Sistem gazdă-patogen	Nivel tisular/celular	Reorganizări intracelulare
Tomate / VAT, VMT, VXC Orz / VMDO Varză / VMCo	Mezofil	• Condensarea cromatinei în special în zona perimembranară, extinderea spațiului intermembranar nuclear, compactizarea nucleolilor. • Fragmentarea, vacuolizarea reticulului endoplasmatic. • Distrucții ale cisternelor aparatului Golgi.
	Endoteci	• Reducerea cristelor mitocondriale; vacuolizarea, fuzionarea mitocondriilor. • Aglutinarea tilacoizilor, fragmentarea membranelor plastidiene, vacuolizarea plastidelor.
	Microspori	• Formarea punților citoplasmice. • Sporirea numărului de peroxizomi.

În condițiile patogenezei virale morfologia mitocondriilor este menținută de o serie de evenimente interconectate și anume vacuolizarea, fuziunea, dezintegrarea structurală. Fuziunea mitocondrială susține schimbul metaboliților matricei și ADN-ului mitocondrial intact, în timp ce dezintegrarea ajută la trierea mitocondriilor afectate, care sunt supuse ulterior procesului de fagie. Se consideră, că fuziunea mitocondrială urmată de mitofagie se stabilește pentru a preveni apoptoza și a facilita astfel infecția productivă. Toate aceste evenimente dinamice sunt generate pentru a asigura procesele concurenționale dintre replicarea genomului viral, sinteza și glicolizarea proteinelor virale cu biosinteza compușilor celulari ai celulei gazde. Implicarea mitocondriilor în supraviețuirea virusurilor este destul de relevantă pentru necesitatea asigurării cu energie și favorizarea ciclurilor lor de reproducere. Totodată, mitocondriile sunt principala sursă de SRO, iar echilibrul între producerea și descompunerea SRO este crucial pentru funcționarea optimă a celulelor [171].

Modificările structurale descrise în patosistemele create dintre tomate și VMT, VXC sau VAT, orz-VMDO, varză-VMCo au prezentat trăsături similare, fiind remarcate deosebiri în gradul de expresie. Organitele sistemului energetic, mitocondriile și plastidele, au expus reliefări

mai puternice la soiul susceptibil Elvira, comparativ cu specia *S. pimpinellifolium* sau varietatea *S. racemigerum*. În cazul infectării cu VAT, virionii erau vizualizați în apropierea sau chiar în matricea plastidelor. Prezența virusurilor în interiorul organitelor este o dovadă a utilizării membranelor tilacoidale în replicarea genomului viral și asamblarea particulelor virale. Complementar particulelor virale în celulele infectate, cu o frecvență mai majoră în țesutul tapetal și endoteci erau vizualizate structuri, precum agregatele cristaloide specifice VAT, incluziuni concentrice membranare, *Pinwheels*, caracteristice VXC, formațiuni membranare (Figura 7.2). Pentru formarea acestor formațiuni virusurile modifică metabolismul în primul rând al acizilor grași, induc rearanjarea componentelor membranelor și, de asemenea, invocă constituenții celulari pentru sinteza enzimelor esențiale necesare pentru replicarea lor.

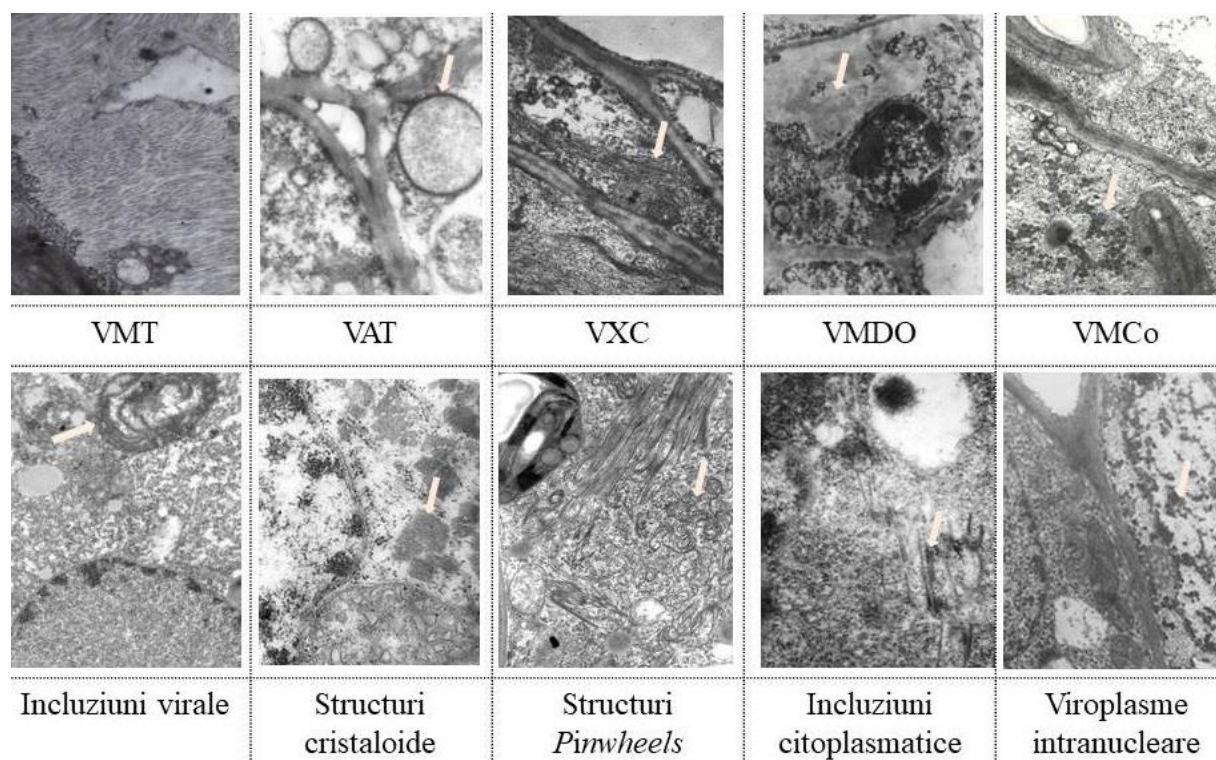


Fig. 7.2. Structuri specifice induse de infecțiile virale în sistemele virus-gazdă.

Vacuolizarea reticulului endoplasmatic ajută virusurile să formeze compartimente de protecție. De asemenea, incluziunile citoplasmatic, inclusiv viroplasmale, concentrează proteinele virale și ale gazdei necesare pentru replicarea genomului viral, dar și protejează genomul viral de nucleazele celulare [158].

Dezvoltarea simptomelor în sistemele compatibile plantă-virus este legată de stabilirea stresului oxidativ. SRO, în special peroxidul de hidrogen, au efecte duale, provocând restructurări ale organitelor, necrotizarea celulelor ce duc la izolarea agentului patogen (i) și

semnale de inducere a antioxidanților cu activarea genelor asociate cu patogeneza (ii) [180]. Riedle-Bauer M. [352] a descris, că acumularea SRO, precum și echilibrul dintre creșterea stresului oxidativ și nivelurile antioxidante pot juca un rol important în dezvoltarea simptomelor în plantele sistemic infectate. Conform altor studii este sugerat, că la o interacțiune compatibilă, inducerea timpurie a enzimelor antioxidante poate interfera cu semnalizarea SRO implicate în reacțiile de apărare a gazdei [52]. Cu toate acestea, răspunsul enzimelor antioxidante în asemenea sisteme este foarte variat, motiv pentru care poate fi atestată atât creșterea, cât și atenuarea reacțiilor antioxidante [97; 181; 258]. Atât majorarea, cât și scăderea stresului oxidativ sunt utilizate ca strategii de supraviețuire de către virusuri [158].

Infecțiile provocate de VAT și VMT la genotipurile sensibile de tomate au contribuit la amplificarea fluctuațiilor activității peroxidazei și polifenoloxidazei la plantele virozate și descendenții acestora, cu o intensitate dependentă de genotip. Utilizarea în studiu a genotipurilor cu diferită reacție (susceptibilitate și toleranță) a permis scoaterea în evidență majorarea activității antioxidante în condiții de patogeneză la genotipurile cu toleranță (*S.pimpinellifolium*), în timp ce la soiurile susceptibile activitatea peroxidazei a fost în declin.

Conform datelor din literatură, tobamovirusurile (VMT și VMT_o) cauzează modificări ale activității peroxidazei, catalazei, precum și a parametrilor stresului oxidativ (conținutului de H₂O₂), prezentând o creștere semnificativă a POX la 24 de ore după inocularea tomatelor, în timp ce la ardei s-a stabilit o sporire mai atenuată a activității POX [280]. Totodată infecția virală a indus la ambele gazde o reducere a activității catalazei. În aceste sisteme, interacțiunile gazdă-patogen au dus la acumularea cantităților de H₂O₂ și, în consecință, la niveluri mai ridicate de oxidare a proteinelor și lipidelor.

Diferențe în metabolismul SRO au fost stabilite la specia *Nicotiana benthamiana* infectată cu tulpini de diferită agresivitate ale virusului marmorării ușoare a ardeiului (*Pepper Mild Mottle Virus*, PMMoV) [168]. Plantele infectate cu tulpina mai puțin virulentă, au exprimat capacitate de recuperare după 21 zile de la inoculare, în timp ce tutunul infectat cu tulpina mai agresivă au prezentat un nivel mai redus pentru proteinele componente ale FS II implicate în fotofosfolilarea oxidativă și o creștere dramatică a parametrilor stresului oxidativ. Autorii concluzionează asupra asocierii magnitudinii stresului oxidativ și a răspunsului antioxidant cu severitatea simptomelor. Date similare sunt prezentate pentru plantele de cartof infectate cu tulpini a virusului Y al cartofului de diferită agresivitate [235], la care se constată răspunsuri diferențiate ale activității antioxidante și o expresie mai mare a anumitor gene, cum ar fi APX, GPX, GR și GST la plantele infectate cu tulpina mai virulentă.

Urmare a studiilor realizate, s-a constatat că VMDO conduce la modificarea expresiei genelor antrenate în stresul antioxidant (APX și SOD). Soiurile de orz de primăvară Galactic, Sonor și Unirea au prezentat diminuarea activității transcripționale a genei APX cu cca 35-46% și 18-31% a genei SOD la plantele infectate, comparativ martorului.

SRO pot fi produse în compartimente celulare în timpul proceselor de transport al electronilor și de către un număr mare de enzime, inclusiv de NADPH-oxidaza legată de membrane, diferite oxidaze și peroxidaze asociate peretelui celular [325]. Un rol important în producerea SRO ca rezultat al interacțiunii plantă-virus este atribuit diferitelor organe intracelulare (mitocondrii, cloroplaste, peroxizomi). Mitocondriile, organe responsabile de respirație, joacă un rol important în protejarea gazdei față de agenții patogeni, inclusiv virusuri. În membrana internă mitocondrială sunt localizate oxidazele alternative (AOX), constituate a căii citocromice de producere a electronilor și acumulare a SRO (Figura 7.3). Este demonstrat, că pierderea rezistenței tutunului de tip RH la VMT la temperaturi ridicate ($>30^{\circ}\text{C}$) este asociată cu represiia expresiei ARNm pentru AOX, ceea ce sugerează că AOX mitocondrial contribuie la reglarea nivelurilor SRO în cazul RH. Astfel, creșterea producției de SRO de natură mitocondrială și controlul prin AOX sunt considerate factori-cheie a rezistenței plantelor la virusurile care sunt în contact strâns cu mitocondriile, precum VMT, VAT.

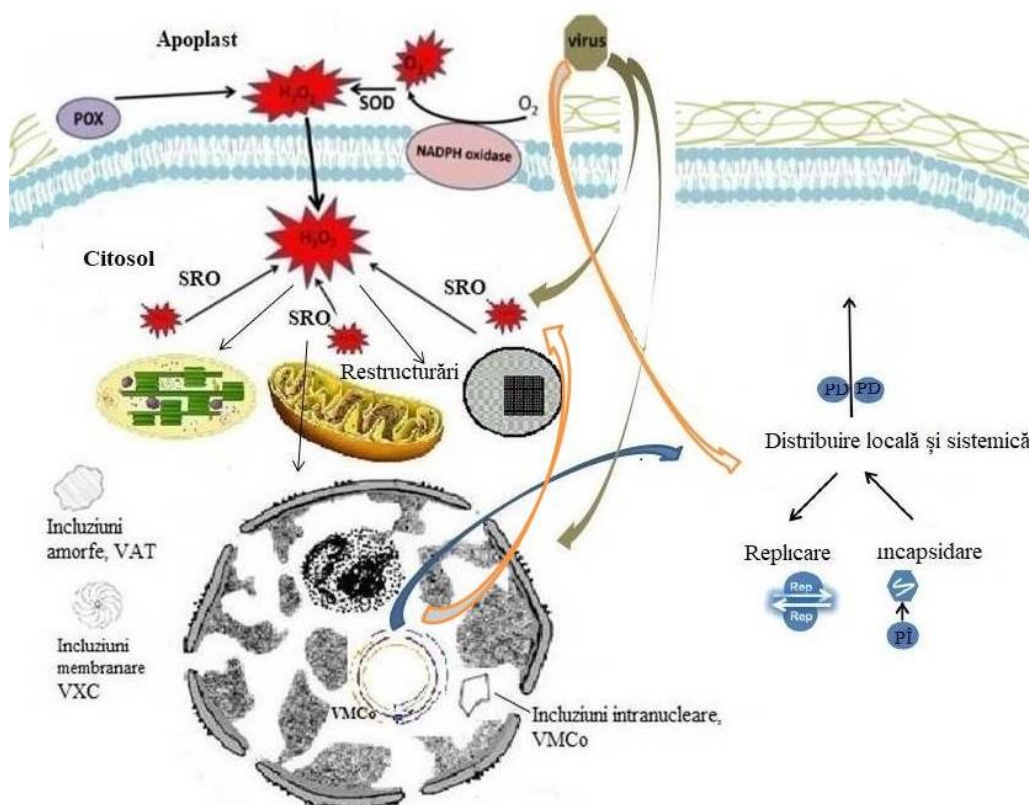


Fig. 7.3. Răspunsul antiviral în sistemele compatibile virus-gazdă (originală).

Virozele provocate de acești patogeni au condus la genotipurile susceptibile de tomate la degradări ale structurii interne a celulelor țesuturilor infectate (țesuturilor asimilatoare ale mezofilului, de protecție și trofice ale anterelor), dar și a celor învecinate aflate în dependență de primele (celulelor arhesporale). Gradientul restructurărilor organelor sistemului vacuolar (reticulului endoplasmatic, aparatului Golgi, lizozomilor), energetice (mitocondriilor, plastidelor) a fost dependent de gradul de patogenitate în sistemele experimentale caracterizate prin susceptibilitate. Infecțiile productive provocate de VAT, VMT au condus la modificări complementate la nivel ultrastructural de sporirea numărului de peroxizomi, granulelor de compuși fenolici, atestate cu o frecvență mai înaltă la genotipurile cu toleranță. Este bine cunoscută implicarea acestor structuri în reacțiile oxidative. În peroxizomi, acizii grași sunt metabolizați în glioxilat prin reacții de reducere a excesului de SRO (H_2O_2) (Figura 7.3). Rolul H_2O_2 peroxizomal prin sporirea efectelor oxidative în inducerea rezistenței la virusuri este susținut de Talarczyk A. și coaut. [399].

Date similare sunt expuse de Shang J. și colab. [376] care au raportat diferențe între zonele histopatice (țesuturi îngălbenite și insulițe verzi) ale frunzelor plantelor de *N. tabacum* sistemic infectate cu virusul mozaicului castraveților. Conform autorilor, porțiunile îngălbenite cu un conținut mai redus de clorofilă ce conțin multiple particule virale, prezintă diminuarea intensității fotosintezei comparativ cu sectoarele verzi și acumulări excesive de H_2O_2 , creșterea activității catalazelor și peroxidazelor. Drept consecință a acumulării SRO, în ambele tipuri histopatice ale frunzelor infectate se produce sporirea oxidării lipidelor, dar cu o intensitate mai majoră în porțiunile îngălbenite, ceea ce relevă un stres oxidativ mai masiv. Totodată, în porțiunile verzi a fost relatată o concentrație mai mare a O_2^- .

Mai mulți autori consideră, că răspunsul plantelor la infectarea sistemică sunt similare senescentei [180; 98; 112]. Chiar și în cazul infecțiilor compatibile, o semnalizare rapidă și eficientă a SRO are ca rezultat o suprimare parțială a virusului [59; 168]. La etapele timpurii ale patogenezei, pentru un timp scurt, se activează răspunsurile antioxidante care interferează cu semnalizarea SRO necesare pentru inițierea răspunsurilor de rezistență. La etapele avansate de patogeneză, are loc un dezechilibru al metabolismului antioxidant ce contribuie la dezvoltarea în țesuturile afectate a simptomelor asemănătoare senescentei. În cazul infecțiilor sistemice, amploarea stresului oxidativ și a răspunsului antioxidant este asociată cu severitatea simptomelor. Eficiența reacțiilor de apărare în timpul interacțiunilor plantă-virus este determinată de viteza răspunsului gazdei asistată de acumularea timpurie și localizată la locurile de infecție a SRO. O reacție foarte rapidă a gazdei poate conduce la eliminarea timpurie a virusului fără inducerea stresului oxidativ (în cazul rezistenței extreme). În răspunsul antioxidant

întârziat și mai puțin eficient este admis un anumit grad de replicare și producere a stresului oxidativ (asistat de moartea celulară) și stabilirea HR [180]. Totodată rolul SRO și a metabolismului antioxidant în dezvoltarea simptomelor în sistemele compatibile plantă-virus, precum și în generarea semnalelor de patogenitate în locurile îndepărtate de la *site*-ul inoculării rămân neelucidate.

Răspunsurile antioxidante sunt parțial reglate de către agenți non-enzimatici, precum metaboliții secundari, compuși fenolici, steroidalii [180]. În sistemele patologice evaluate de noi se remarcă acumulări sporite de α -tomatină (glicoalcaloid steroidal) în celulele pețiolilor genotipurilor de tomatelor tolerante sau deținătoare de gene de rezistență comparativ cu cele susceptibile. Aceste rezultate denotă efectul specific al compușilor steroidalii în reacția plantei la virusuri.

Majoritatea răspunsurilor mediate de compuși non-enzimatici (acidul ascorbic, glutationul redus, compuși fenolici și steroidalii) în cazul patogenezelor virale, mediază modificări transcripționale în expresia genelor de apărare prin interacțiuni cu factorii de transcripție specifici [120]. Infecția compatibilă produsă de VMCo la plantele de arabidopsis a activat expresia genelor cuplate cu răspunsurile defensive care implică acidul salicilic, acidul jasmonat/etilena și SRO ca molecule de semnalizare [271].

Supraexpresia genei PR-5, legată de stresul mediat de calea de semnalizare dependentă de etilenă sau jasmonat [236], a fost raportată de noi pentru soiurile de orz de primăvară Galactic, Sonor și Unirea infectate cu VMDO. O creștere de 4,6 ori a fost detectată pentru plantele variantei experimentale a s.Galactic, genotip care a prezentat și cea mai accentuată reducere a activității transcripționale a APX, genă implicată în procesele de detoxifiere a peroxidului de hidrogen. În aceste sisteme patologice a fost stabilită modificarea expresiei și altor gene asociate cu patogeneza, precum PR-10, genă cu activitate ribonucleazică implicată în protecția antivirală. Activitatea transcripțională a 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, iar la s. Unirea s-a stabilit sporirea activității cu 16,8%. Date similare au fost raportate în aprecierea activității transcripționale a genei PR-3, implicate în declanșarea procesului infecțios, ce denotă reducerea concentrației relative a transcripților la plantele infectate a s. Galactic și s. Sonor (de 4,2 și 14,6 față de martor), în timp ce la s. Unirea se atestă o creștere cu 12%. Rezultatele obținute denotă complexitatea procesului de patogeneză și evidențiază faptul, că reacția plantelor la infecțiile virale este diferită ca formă de manifestare, fiind dependentă de genotip.

Conform unor autori [223; 240], complementar perturbărilor transcripționale, virusurile declanșează, de asemenea, modificări ale cromatinei, incluzând metilarea ADN și creșterea

frecvenței recombinărilor omoloage, modificări epigenetice care pot fi moștenite de către descendenți. Astfel, la urmașii plantelor infectate cu TMV a fost atestată creșterea ratei de recombinare omoloagă, sporirea rearanjamentelor ADN-ului și hipometilarea repetărilor bogate în leucine, locilor omologi cu gena N (gena rezistenței la VMT) [72]. Potrivit lui Boyco A. și Kovalchiuc I. [73], infecția produsă de un virus compatibil are ca rezultat activarea diferitelor semnale, cum ar fi ARN-urile mici, ce se răspândesc sistemic de la locul infectării la țesuturile neinfectate, inclusiv cele care formează gameții. Semnalul generat conduce la diminuarea sau amplificarea metilării ADN în anumite *site*-uri specifice, efect care poate fi transmis la descendenți.

În cercetările noastre s-a stabilit, că virusurile VAT, VXC, VMT, precum și VMDO, provoacă la gazdele susceptibile redistribuirea și inducerea schimburilor cromatidice cu modificarea frecvenței recombinării meiotice, inducerea aberațiilor cromozomiale și destabilizarea microsporogenezei (Tabelul 7.2.).

Tabelul 7.2. Modificări meiotice sub influența infecțiilor virale la plantele gazdă și descendenții plantelor infectate

Restructurări meiotice		Tomate (s. Fachel, s. Nistru, s. Prizior, s. Elvira, <i>S. racemigerum</i>)			Orz de primăvară (s. Galactic, s. Sonor, s. Unirea)	
		VAT	VXC	Descendenți	VMDO	Descendenți
Recombinare meiotică	Sporirea numărului de chiasme	+	+	+	+	+
	Fluctuații ale tipurilor de chiasme	+	+	+	+	+
	Sporirea numărului de univalenți	+	+	-	+	-
Aberații meiotice	Sporirea CMP cu aberații	+	+	-	+	-
	Sporade anormale	+	+	-	+	-
Derularea microsporogenezei	Sporirea asincronismului	+	+	-	+	-
	Sporirea eterogenității	+	+	-	+	-
	Accelerarea diviziunilor meiotice	+	+	-	+	-

Efectul mitogen și aneugen, constatat în baza testului schimburilor dintre cromatidele surori la plantele infectate, a avut repercusiuni la descendenții genotipurilor virozate cu o potență specifică genotipului. Spectrul modificărilor citogenetice produse de virusurile VAT, VXC, VMT la genotipurile gazdă de tomate a fost similar celui cauzat de VMDO la orzul de primăvară. Virusurile menționate se caracteriză prin deținerea unui genom ARNm_c (+) monopartit (VAT, VXC, VMT) sau pluripartit (VMDO) și o strategie analoagă de replicare.

Reacțiile de patogenitate descrise la genotipurile gazdă de tomate și orz de primăvară caracterizate prin susceptibilitate au manifestat modificări tipice ale proceselor de diviziune mitotică, meiotică, cu repercusiuni la descendenții plantelor infectate. În sistemele virus-gazdă cu toleranță, amplitudinea distorsiunilor citogenetice a fost modulată, fiind în dependență directă de gradul de agresivitate a patogenului și nivelul de expresie a modificărilor macro- și microstructurale.

Răspunsul plantelor la infecțiile virale include diverse niveluri de complexitate [148]. După infectare plantele pot dezvolta mai multe căi cooperante în dezvoltarea reacțiilor de apărare sau a procesului infecțios, care depind de echilibrul dintre procesele desfășurate concomitent. Înțelegerea interacțiunii dintre virusuri și gazde este esențială pentru explicarea modului în care virusurile depășesc barierele de apărare ale plantelor, cauzează modificări de diferită virulență în dezvoltarea strategiilor de rezistență antivirală.

Realizările conceptuale și metodologice ale virusologiei contemporane denotă clar, că virusurile plantelor sunt elemente esențiale ale ecosistemelor prin stabilirea relațiilor mutualiste în asigurarea funcționalității și adaptabilității ecosistemelor la schimbările de mediu [252], reprezentând un factor cheie al selecției [232].

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 germeni 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 radiculelor 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 nucleoplasmatic 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 variation*) 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 (lățimea, lungimea frunzulițelor; raportul lățime/lungime a frunzulițelor; numărul de frunzulițe; lungimea rădăcinii, tulpiniței) și biochimici (conținutul de substanțe uscate, proteine totale; activitatea peroxidazei) a scos în evidență extinderea diversității, contribuția procentuală a caracterului analizat constituind peste 60%. Drept indici relevanți în evaluarea diversității somaclonale generate de infecția virală pot fi utilizați lungimea tulpiniței și conținutul de substanțe uscate (cap. 6, [1]).
10. În baza analizei caracterelor morfofiziologice, biochimice în populațiile de tomate libere de virusuri descendente de la părinți infectați a fost stabilită extinderea distribuției valorilor caracterelor cantitative, precum ar fi numărul total de fructe per plantă, masa unui fruct, numărul de semințe a unui fruct, numărul de chiorchine cu fructe. Evaluarea coeficientului de variație a caracterelor studiate a scos în evidență posibilitatea modificării interdependenței dintre unele caractere moștenite în *linkage* (cap. 6, [6; 14; 20]).
11. Investigațiile citogenetice ale proliferării celulare în condițiile de infecție virală au demonstrat însușirile mitogene și genotoxice ale agenților virali dependente de particularitățile sistemului genotip gazdă-patogen. Modificările induse de fitovirusuri se realizează prin reacții de răspuns a plantelor la factorii exogeni determinate genetic și epigenetic (cap. 6).

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. În scopul extinderii variabilității genetice și obținerii de forme cu caractere nespecifice formelor inițiale la tomate, orz de primăvară se propune utilizarea procedeele bazate pe infectarea gazdelor și selectarea genotipurilor cu îmbinări netipice la descendenții plantelor infectate cu virusuri.
2. Activitatea polifenoloxidazei, gradul de înmagazinare al α -tomatinei se recomandă pentru aplicare în diferențierea reacției genotipurilor de tomate la infecțiile virale.
3. Izoformele esterazelor specifice locilor Est 1 – Est 2 pot fi utilizate în aprecierea efectelor recombinogene, Est 5 și spectrul polimorfic al hordeinelor – pentru estimarea polimorfismului biotipic indus de infecția virală la orzul de primăvară.
4. Nivelul de expresie relativă a genei PR-5 se recomandă pentru utilizare în testarea patogenității 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 obținerea de regeneranți cu un spectru mai larg de variații morfologice și a caracterelor cantitative față de metoda tradițională de creare a somaclonelor.
6. Rezultatele evaluării compartimentării celulare și tisulare, diviziunilor celulare, relațiilor gazdă-patogen constituie suport metodologic în asigurarea cursurilor disciplinelor *Biologia celulară*, *Histologie vegetală* și lucrărilor practice *Metode citologice de examinare a celulelor și țesuturilor* pentru studenții cilului I, Universitatea de Stat din Moldova.

BIBLIOGRAFIE

surse în limă română

1. **ANDRONIC, L.** Aspectul morfologic al tetradelor – criteriu în aprecierea regularității dividerilor meiotice la plante în condiții de patogeneză virală. In: *Structura și funcționalitatea sistemelor biologice – diversitate și universalitate*. Conferința Științifică în memoria academicianului Boris Matienko, 17 Noiembrie 2011, Chișinău, 2011, pp. 12-15. ISBN: 978-9975-56-015-3.
2. **ANDRONIC, L.** Bazele citogenetice ale variabilității genetice la plantele de cultura în condiții de patogeneză virală. Chișinău: Print-Caro, 2020, 236 p., ISBN 978-9975-56-762-6.
3. **ANDRONIC, L.** *Biologie celulară*. Chișinău, 2017, Tip. Biotehdesign, 207 p. ISBN: 978-9975-108-21-8.
4. **ANDRONIC, L.** Evidența anomaliilor meiotice la tomate în cazul acțiunii combinate a razelor gama și infecției virale. In: *Probleme actuale ale geneticii, fiziologiei și ameliorării plantelor*. 9-10 octombrie 2008, Chișinău, 2008, pp.8-13. ISBN: 978-9975-78-667-6.
5. **ANDRONIC, L.** Polimorfismul unor enzime în populațiile orzului de primăvară (*Hordeum vulgare* L.), obținute în condiții de infecție virală. In: *Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor*. Conferința științifică internațională, Chișinău, 23-24 octombrie 2014, pp.182-185, ISBN: 978-9975-56-194-5.
6. **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.
7. **ANDRONIC, L., BUJOREANU, V.** Studiul citogenetic al procesul de microsporogeneza la plantele de tomate în condiții de patogeneză virală. In: *Cercetări de genetică vegetală și animală*. Fundulea. 2000, vol. VI, pp. 123 - 129. ISSN: 1025-6024.
8. **ANDRONIC, L., BUJOREANU, V.** Virusurile tomatelor – citopatologie și diagnostic. In: *Agricultura Moldovei*, nr. 1-2, 2015, pp. 31-34. ISSN: 0582-5229.
9. **ANDRONIC, L., BUJOREANU, V., ARTEMI, C.** Reacții specifice citopatice induse de viroze la tomate. In: *Rezultatele și perspectivele cercetărilor la cultura plantelor de câmp în Republica Moldova*. Conferința științifico-practică consacrată aniversării a 70-a a fondării ICCS Selecția, Bălți 20 iunie, 2014, pp. 68-72. ISBN: 978-9975-53-343-0.
10. **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.
11. **ANDRONIC, L., JACOTĂ, A.** Evidența schimburilor între cromatidele surori la orz (*Hordeum vulgare* L.) în cazul infecției virale. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2009, nr. 2 (308), pp. 57-64. ISSN: 1857-064X.
12. **ANDRONIC, L., JACOTĂ, A., GRIGOROV, T., BUJOREANU, V.** Studiul dividerilor mitotice în meristemele radiculare la orz în diverse condiții de patogeneza virală. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2009, nr. 3 (309), pp. 74-81. ISSN: 1857-064X.
13. **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.
14. **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 Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2011, nr. 1 (313), pp. 73-79. ISSN: 1857-064X.

15. **ANDRONIC, L.I.** Studiul variabilității somaclonale induse de virusul mozaicului conopidei la plantele gazdă. In: *Analele USM, Studia Universitatis, Științe reale și ale naturii*. 2008, vol. 7 (17), pp. 28-32. ISSN: 1857-1735.
16. **BADEA, E.M., SÂNDULESCU, D.** *Biotehnologii vegetale*. Fundația Biotech, București, 2001, 295 p. ISBN: 973-9334-70-9.
17. **BUJOREANU, V., SMEREA, S., CHIRIAC, GH.** Reacția somaclonelor de cartof la infectarea cu virusul Y al cartofului. In: *Probleme actuale ale geneticii, biotehnologiei și ameliorării*. Confer. Naț. (jubiliară) cu participare Internațională. Chișinău, 2005, pp. 21-23. ISBN: 9975-64-034-6.
18. *Controlul genetic al caracterelor de rezistență și productivitate la grâul comun*. Coord. Galina Lupașcu. Chișinău: Tipografia AȘM, 2015, 174 p. ISBN: 978-9975-62-385-8.
19. **COTEȚCHI, L.** *Bazele imunogenetice ale rezistenței culturilor leguminoase la fitopatogeni*. Chișinău. 2013, 190 p. ISBN: 978-9975-4043-0-3.
20. **DUCA, M.** Aspecte privind mecanismele de rezistență ale florii-soarelui la lupoai. In: *Akademios*, nr. 4 (55), 2019, pp. 34-43. ISSN: 1857-0461.
21. **DUCA, M., PORT, A., CLAPCO, S.** Aspecte de genetică funcțională la plante. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2016, nr. 1 (328), pp. 50-74. ISSN: 1857-064X.
22. **DUCA, M., PORT, A., ȘESTACOVA, T.** Particularități morfo-fiziologice și genetico-moleculare ale interacțiunii *Helianthus annuus* L. – *Plasmopara halstedii* F. Berl et de Toni. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2012, nr. 3 (318), pp. 23-35. ISSN: 1857-064X.
23. **GRIGOROV, T., SMEREA, S., ANDRONIC, L., BERZOI, V.** Variabilitatea caracterelor cantitative la orz în generațiile M₀-M₃ la plantele supuse acțiunii infecției virale. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2013, nr. 3 (321), pp. 83-89. ISSN: 1857-064X.
24. **LUPAȘCU, G.** Rolul factorului parental și interacțiunilor genice la elaborarea tehnologiilor de creare a genotipurilor de plante cu însușiri valoroase. In: *Intellectus*, 2016, nr. 1, p. 89-93. ISSN 1810-7079.
25. **LUPAȘCU, G., ANDRONIC, L., SMEREA, S., MIHNEA, N.** Rolul relațiilor gazdă-patogen în declanșarea bolilor la plante și identificarea genotipurilor rezistente. In: *Akademios*. 2019, nr.3 (54), pp. 33-39. ISSN: 1857-0461.
26. **MARIL, L., ANDRONIC, L., CUPCEA, I.** Impactul infecției virale în inducerea variabilității caracterelor cantitative la genotipurile de tomate cu diferit grad de reactivitate la agentul viral. In: *Știința și inovarea în nordul Republicii Moldova: probleme, realizări, perspective*. Conferința științifică națională cu participare internațională (ediția a treia), 21-22 iunie 2019, Bălți, pp.137-142. ISBN: 978-9975-3316-1-5.
27. **PALII, A.** Studiul și utilizarea variabilității genetice în ameliorarea calității bobului la specia *Zea mays* L. In: *Akademios*. 2008, nr. 4(11), p. 66-71. ISSN: 1857-0461.
28. **ROTARI, A., COMAROV, G., FRUNZE, I. et al.** Identificarea liniilor homozigote de porumb după polimorfismul genetic al zeinei. In: *Cercetări de genetică vegetală și animală*. Fundulea-România. 1996, vol. IV, pp. 71-79. ISSN: 1025-6024.
29. **SMEREA, S.** Variabilitatea somaclonală și indusă de infecția virală la cartof. În: *Probleme actuale ale geneticii, fiziologiei și ameliorării plantelor*. Conferința Națională cu participare internațională, 9-10 octombrie 2008. Chișinău p. 213-218. ISBN: 978-9975-78-667-6.
30. *Tratat de virusologie medicală*. N. Cajal, Ed. Medicala. Vol. I. 1990, 732 p. ISBN 973-39-0073-7.

31. ABBO, S., DUNFORD, R.P., MILLER et al. Primer-mediated *in situ* detection of the B-hordein gene cluster on barley chromosome 1H. In: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1993, vol. 15, nr. 90 (24), pp. 11821–11824. ISSN: 1091-6490.
32. AKSOY, O. Detection of environmental mutagens through plant bioassays. In: *Plant Ecology – Traditional Approaches to recent Trends*. InTech, 2017, Chapter 2, p.11. ISBN 978-953-51-3339-1.
33. ALBAR, L., BANGRATZ-REYSER, M., HÉBRARD, E. et al. Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus. In: *Plant J*. 2006, vol. 47, pp. 417–426. ISSN: 1365-313X.
34. ALI, H., GHORI, Z., SHEIKH, S., GUL, A. Effects of gamma radiation on crop production. In: *Crop Production and Global Environmental Issues*, Hakeem K.R. (ed.), Springer International Publishing. 2016, pp. 23-78. ISBN: 978-3-319-23162-4.
35. ANAND, S.K., TIKOO, S.K. Viruses as modulators of mitochondrial functions. In: *Adv Virol*. 2013, pp.1-17. ISSN: 1687-8639.
36. ANDERSON, L.K., COVEY, P.A., LARSEN, L.R. et al. Structural differences in chromosomes distinguishes species in the tomato clade. In: *Cytogenet. Genome Res*. 2010, vol. 129(1-3), pp. 24-34. ISSN: 1424-859X (web).
37. ANDERSON, L.K., STACK, S.M. Meiotic recombination in plants. In: *Current Genomics*. 2002, vol. 3, pp.507-525. ISSN: 1875-5488 (web).
38. ANDERSON, L.K., STACK, S.M. Recombination nodules in plants. In: *Cytogenet Genome Res*. 2005, vol.109, pp.198-204. ISSN: 1424-859X (web).
39. ANDREEVA, I.A., BURTSEVA, Yu. V., MALINOVSKY, V.I., ZVYAGINTSEVA, T.N. The effect of soybean mosaic virus on the activity of carbohydrases in leaves of sensitive and resistant soybean plants. In: *Acta Phytopathol. Entomol. Hung*. 2002, vol. 34 (4), pp. 335-345. ISSN: 0238-1249.
40. ANDREWS, J., BOUFFARD, G.G., CHEADLE, C. et al. Gene discovery using computational and microarray analysis of transcription in the *Drosophila melanogaster* testis. In: *Genome Research*. 2000, vol.10, pp. 2030-2043. ISSN: 15495469.
41. ANDRONIC, L. Analysis of meiotic recombination in barley (*Hordeum vulgare* L.) under viral pathogenesis. Vegetable breeding and seed production. In: Collection of scientific papers. VNISSOK. Moscow. Published in VNISSOK. 2014, vol. 45, pp. 76-86. ISBN: 978-5-901695-62-3.
42. ANDRONIC, L. I., SMEREA, S. 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*. International Conference Saint Petersburg, 27 - 29 September 2017, pp. 422-426. ISBN: 978-5-905-200-34-2.
43. 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, сс. 62-69. ISBN: 978-5-901695-65-4.
44. 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”. December 11-12, 2012, Bucharest, p. 34-36. ISBN: 978-973-558-655-3.
45. ANDRONIC, L. Viruses as trigger of DNA damage in host plants. In: *Canadian Journal of Plant Science*. 2012, vol. 92(6), pp.1083-1091. ISSN: 0008-4220.

46. **ANDRONIC, L., JACOTA, A.G., BUJOREANU, V.V., GRIGOROV, T.B.** Genotoxicity of barley stripe mosaic virus in infected host plants. In: *Central Eur J Biol.* 2010, vol. 5, (5), pp. 633-640. ISSN: 1895-104X.
47. **ANDRONIC, L., MARIU, L., SMEREA, S., SCHIN, V.** Subcellular rearrangements and defense reactions under viral pathogenesis in tomato plants. In: *Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего. II Международная научная конференция, посвященная памяти академика Е.И. Ермакова, Санкт-Петербург, 02-04 октября 2019 г., СПб.: ФГБНУ АФИ. сс. 253-258. ISBN: 978-5-905200-40-3.*
48. **ANDRONIC, L., PORT, A., DUCA, M.** Expression of some genes in barley under viral infection. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții.* 2015, 2 (326), pp. 59-65. ISSN: 1857-064X.
49. **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 конференция, 15-19 апреля 2019 г., Москва, Том II, сс. 7-11, ISBN: 978-5-209-09359.*
50. **ANDRONIC, L.I.** Evidence of meiotic recombination in virus infected tomato. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții,* 2010, nr. 2 (311), pp. 8-16. ISSN: 1857-064X.
51. **ANDRONIC, L., BALASHOVA, I., BUJORIANU, V., SMEREA, S.** Some reactions to virus infections of *Solanum lycopersicum* L. genotypes with different defense response. In: *Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor, Conferința științifică internațională (ediția a VI-a) 9-10 octombrie 2017, Chișinău.* pp. 102-105. ISBN: 978-9975056-463-2.
52. **ARIAS, M.C., LUNA, C., RODRIGUEZ, M. et al.** *Sunflower chlorotic mottle virus* in compatible interactions with sunflower: ROS generation and antioxidant response. In: *Eur J Plant Pathol.* 2005, vol. 113, pp. 223–232. ISSN: 1573-8469.
53. **ARMSTRONG, S.J., CARYL, A.P., JONES, Gh., FRANKLIN, F.C.H.** Asy1 protein, required from chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica*. In: *Journal of Cell Science.* 2002, vol. 115, pp. 3645-3655. ISSN: 1477-9137 (web).
54. **ARMSTRONG, S.J., FRANKLIN, F.C.H., JONES, Gh.** Nucleolus associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. In: *Journal of Cell Science.* 2001, vol. 114, pp. 4207-4217. ISSN: 1477-9137 (web).
55. **ARMSTRONG, S.J., JONES, GH.** Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type *Arabidopsis thaliana*. In: *Journal of Experimental Botany.* 2003, vol. 54 (380), pp.1-10. ISSN 0022-0957.
56. **ARUN, B., JOSHI, A. K. CHAND, R., SINGH, B. D.** Wheat somaclonal variations earliness, improved spot blotch resistance and higher yield. In: *Euphytica.* 2003, pp. 235-241. ISSN: 0014-2336.
57. **ATA, A. T. M., SHAHIN, A. A. B.** C-Heterochromatin and chiasma terminalization in the jerboas *Allactaga* and *Jaculus* (Rodentia : Dipodidae). In: *Belg. J. Zool.* 2006, vol. 136 (1), pp. 59-67. ISSN: 0777-6276.
58. **BACERRA LOPEZ-LAVALLE, L.A., ORJEDA, G.** Occurrence and cytological mechanism of 2n pollen formation in a tetraploid accession of *Ipomoea batatas* (sweet potato). In: *Journal of Heredity.* 2002, vol. 93 (3), pp. 185–192. ISSN: 0022-1503.
59. **BACSO, R. et al.** Inhibition of virus replication and symptom expression by reactive oxygen species in tobacco infected with *Tobacco mosaic virus*. In: *Acta Phytopathology Entomol Hung.* 2011, vol. 46, pp.1–10. ISSN: 0238-1249.

60. BAEBLER, S., KRECIC-STRES, H., ROTTER, A. et al. PVY^{NTN} elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. In: *Molecular Plant Pathology*. 2009, vol. 10, pp. 263–275. ISSN: 1364-3703 (web).
61. BAI, S., LIU, J., CHANG, C. et al. Structure-function analysis of barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance. In: *PLoS Pathog.* 2002, vol. 8 (6): e1002752. ISSN: 1553-7374 (web).
62. BAI, X.F., PEIRSON, B.N., DONG, F.G. et al. Isolation and characterization of SYN1, a RAD21-like gene essential for meiosis in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell*. 1999, vol. 11, pp. 417-430. ISSN: 1532-298X (web).
63. BANERJEE, R., WEIDMAN, M.K., NAVARRO, S. et al. Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. In: *Journal of General Virology*. 2005, vol. 86 (8), pp. 2315–2322. E-ISSN: 1465-2099.
64. BASS, H. W., MARSHALL, W. F., SEDAT, J. W. et al. Telomeres cluster *de novo* before the initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere position before and during meiotic prophase. In: *Journal of Cell Biology*. 1997, vol. 137, pp. 5-18. ISSN: 0021-9525.
65. BAUDAT, F., NICOLAS, A. Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1997, vol. 94, pp. 5213-5218. ISSN: 1091-6490 (web).
66. BELL, O., BURT, A. B-chromosomes: germ-line parasites with induced changes in host recombination. In: *Parasitology*. 1990, vol. 100, pp. 519–526. ISSN: 1469-8161 (web).
67. BERNARDO, R. *Breeding for quantitative traits in plants*. Second edition. 2010. Stemma Press Woodbury, Minnesota. 2010, 400 p. (p.11). ISBN: 978-0-9720724-3-4.
68. BHATTACHARJEE, S., ZAMORA, A., AZHAR, M.T. et al. Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves *Argonaute* 4-dependent translational control. In: *Plant J.* 2009, vol. 58 (6), pp. 940-951. ISSN: 1365-313X.
69. BIELING, L.M., MARIANI, A., BERDING, N. Cytological studies of 2n male gamete formation in sugarcane, *Saccharum* L. In: *Euphytica*. 2003, vol. 133, pp. 127–134. ISSN: 0014-2336.
70. BOCCARD, F., BAULCOMBE, D. Mutational analysis of cis-acting sequence and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. In: *Virology*. 1993, vol. 193, pp. 563-578. ISSN: 1098-5514.
71. BOND, D. M., FINNEGAN, E. J. Passing the message on: Inheritance of epigenetic traits. In: *Trends in Plant Science*. 2007, vol. 12(5), pp. 211-216. ISSN: 1360-1385.
72. BOYKO, A., KATHIRIA, P., ZEMP, F. et al. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants: (virus-induced plant genome instability). In: *Nucleic Acids Res.* 2007, vol. 35, pp. 1714–1725. E-ISSN: 1362-4962.
73. 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. ISSN: 1752-9867.
74. 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. ISSN: 0955-3002.
75. BRAGG, J. N., JACKSON, A. O. Barley stripe mosaic. In: *Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Gramineae)*. H. Lapierre and P. Signoret, eds., Paris: INRA, 2004. pp. 456–457. ISBN-13: 978-1578083770.
76. BRAKKE, M. K., SAMSON, R. G., COMPTON W. A. Recessive alleles found at R and C loci in maize stocks showing aberrant ratio at the A locus. In: *Genetics*. 1981, vol. 99, pp. 481–485. ISSN: 1943-2631 (web).

77. BRANTLEY, B. B., KUHN, C. W. A genetic abnormality causing virus like symptoms and sterility in cowpea. In: *Hort. Science*, 1983, nr.18, pp. 458-459. ISSN: 0862-867X.
78. BULGARELLI, D., BISELLI, C., COLLINS, N. C. et al. The CC-NB-LRR-type Rdg2a resistance gene confers immunity to the seed-borne barley leaf stripe pathogen in the absence of hypersensitive cell death. In: *PLoS ONE*. 2010, vol. 5 (9), e12599. ISSN: 1544-9173.
79. BURGYAN, J., HAVELDA, Z. Viral suppressors of RNA silencing. In: *Trends Plant Sci.* 2011, vol. 16, pp. 265–272. ISSN: 1360-1385.
80. BURNHAM, C. R. *Discussion in Cytogenetics*. Burgess Publishing Co, 1991, Minnesota. ISBN-10: 9991774858.
81. BUSTAMANTE, P. I., HULL, R. Plant virus gene expression strategies. In: *Electronic Journal of Biotechnology*, 1998, vol.1 (2), pp.65-82. ISSN: 0717-3458.
82. CAI, X., XU, S.S. Meiosis-driven genome variation in plants. In: *Curr. Genomics*, 2007, vol. 8(3), pp. 151–161. ISSN: 1389-2029.
83. CALLOW, J.A. *Biochemical Plant Pathology*. John Wiley & Sons. 1983. 484 p. ISBN-10: 0471900923.
84. CANADY, M.A., JI, Y., CHETELAT, R.T. Homeologous recombination in *Solanum lycopersicoides* introgression lines of cultivated tomato. In: *Genetics*. 2006, nr. 174, pp. 1775-1788. ISSN: 1943-2631.
85. CARLI, D. I. M., BENVENUTO, E., DONINI, M. Recent insights into plant-virus interactions through proteomic analysis. In: *J Proteome Res.* 2012, vol. 11 (10), pp. 4765-4780. ISSN: 1535-3907 (web).
86. CARR, J. P., LEWSEY, M. G., PALUKAITIS, P. Signaling in induced resistance. In: *Adv. Virus Res.* 2010, vol. 76, pp. 57–121. ISSN: 0065-3527.
87. CATALÁ, M., NUEZ, F. Tomato fruit set under low temperatures. In: *Acta Horticulturae*. 1990, nr. 287, pp. 171-178. E-ISSN 2406-6168.
88. CAVERZAN, A., CASASSOLA, A., BRAMMER, S. P. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. In: *Abiotic and biotic stress in plants – recent advances and future perspectives*. 2016. Chapter 20, 467 p. ISBN: 978-953-51-2250-0.
89. CESARI, S., THILLIEZ, G., RIBOT, C. et al. The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. In: *Plant Cell*. 2013, vol. 25, pp. 1463–1481. ISSN: 1532-298X (web).
90. CHAO, L., WANG, Z. Z., DANIEL, J. A. Chemical imaging of trichome specialized metabolites using contact printing and laser desorption/ionization mass spectrometry. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014, vol. 406, pp. 171–182. E-ISSN: 1618-2650 (web).
91. CHAVEZ-CALVILLO, G., CONTRERAS-PAREDES, C.A., MORA-MACIAS, J. et al. Antagonism or synergism between papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in *Carica papaya* is determined by their order of infection. In: *Virology*. 2016, nr. 489, pp. 179–191. ISSN: 1098-5514.
92. CHEN, Y., LIU Z., HALTERMAN, D. A. Molecular determinants of resistance activation and suppression by *Phytophthora infestans* effector IPI-O. In: *PLoS Pathog.* 2012, 8, e1002595. ISSN: 1553-7374 (web).
93. CHIRIAC, Gh. I., ANDRONIC, L., BUJOREANU, V.V., MARIU, L. I. Features of crossing-over in virus-infected tomato. In: *Central Eur. J Biology*. 2006, vol. 1, nr.3, pp. 386-398. ISSN: 1895-104X.
94. CHU, S., DERISI, J., EISEN, M. et al. 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. In: *Science*. 1998, nr. 282, pp. 699-705. ISSN: 1095-9203 (web).

95. CITOVSKEY, V., ZALTSMAN, A., KOZLOVSKY, S.V., GAFNI, Y., KRICHEVSKY, A. Proteasomal degradation in plant-pathogen interactions. In: *Seminars in Cell Dev. Biol.* 2009, vol. 20, pp. 1048–1054. ISSN: 1096-3634 (web).
96. CLARK, M.F., ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent detection of plant viruses. In: *J. Gen. Virol.* 1977, vol.34, pp. 475–483. ISSN: 1465-2099 (web).
97. CLARKE, S.F., GUY, P.L., BURRITT, D.J., JAMESON, P.E. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. In: *Physiol Plant.* 2002, vol. 114, pp. 157–164. ISSN: 1399-3054.
98. CLEMENTE-MORENO, M.J., HERNÁNDEZ, J.A., DIAZ-VIVANCOS P. Sharka: How do plants respond to Plum pox virus infection? In: *J Exp Bot.* 2015, vol. 66, pp. 25–35. E-ISSN:1460-2431 (web).
99. CLEWER, A.G., SCARISBRICK, D.H. *Practical statistics and experimental design for plant and crop science.* John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 2001. 332 p. ISBN: 0-471-89908-9.
100. COLLIER, S. M., HAMEL, L. P., MOFFETT, P. Cell death mediated by the N-terminal domains of a unique and highly conserved class of NB-LRR protein. In: *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011, vol. 24, pp. 918–931. E-ISSN: 1943-7706.
101. COLLIER, S. M., MOFFETT, P. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. In: *Trends Plant Sci.* 2009, vol. 14, pp. 521–529. ISSN: 1360-1385.
102. CORNFORTH, M. N., BEDFORD, J. S. Ionizing radiation damage and its early development in chromosomes. In: *Advances in radiation biology.* 1993, vol. 17, pp.507–511. ISSN: 0065-3292.
103. CORTÉS, F., DAZA,P., PIÑERO,J., ESCALZA,P. Evidence that SCEs induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes. In: *Environ. Mol. Mutagen.* 1994, vol. 24, pp. 203–207. ISSN: 0893-6692.
104. COSSON, P., SCHURDI-LEVRAUD, V., LE, Q. H. et al. The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: natural variation of the RTM genes and evidence for the implication of additional genes. In: *PLoS ONE.* 2012, 7:e39169. ISSN: 1932-6203.
105. CSORBA T., PANTALEO V., BURGYN J. RNA silencing: an antiviral mechanism. In: *Adv. Virus Res.* 2009, nr. 75, pp. 35–71. ISSN: 0065-3527.
106. CULVER, J. N., PADMANABHAN, M. S. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. In: *Annu Rev Phytopathol.* 2007, vol. 45, pp. 221–243. ISSN: 0066-4286.
107. DAVID, C., GARGOURI-BOUZID, R., HAENNI, A. L. RNA replication of plant viruses containing an RNA genome. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 1992, vol. 42, pp.157-227. ISSN: 1878-0814.
108. de RONDE, D., BUTTERBACH, P., KORMELINK, R. Dominant resistance against plant viruses. In: *Front Plant Sci.* 2014, vol. 5, pp. 1-17. ISSN: 1664-462X.
109. d'ERFURTH, I., CROMER, L., JOLIVET, S. et al. The cyclin-A CYCA1; 2/TAM is required for the meiosis I to meiosis II transition and cooperates with OSD1 for the prophase to first meiotic division transition. In: *PLoS Genet.* 2010. ISSN: 1553-7404 (web).
110. DESENDER, S., ANDRIVON, D., VAL, F. Activation of defence reactions in *Solanaceae*: where is the specificity? In: *Cell Microbiol.* 2007, vol. 9, pp. 21–30. ISSN: 1462-5814.
111. DHALE, D. A. Histochemical investigation on some medical plants. In: *Advance Research in Pharmaceuticals and Biological.* 2011, vol 1(2), pp. 147-154. ISSN 2250 – 0744.

112. DÍAZ, E., JORDÀ, M., PEINADO, M., RIVERO, A. Epigenetics of host–pathogen interactions: The Road Ahead and the Road Behind. In: *PLoS Pathogens*. 2012, vol.11, e1003007. ISSN: 1553-7374 (web).
113. DIAZ-VIVANCOS, P., CLEMENTE-MORENO, M.J., RUBIO, M. et al. Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to Plum pox virus. In: *J Exp Bot*. 2008, vol. 59, pp. 2147–2160. ISSN: 1460-2431 (web).
114. DIJKWEL, P.P., KOCK, P.A.M., BEZEMER, R. et al. Sucrose represses the developmentally controlled transient activation of the plastocyanin gene in *Arabidopsis thaliana* seedlings. In: *Plant Physiol*. 1996, vol. 110, pp.455–463. ISSN: 1532-2548.
115. DING, S. W. RNA-based antiviral immunity. In: *Nat. Rev. Immunol*. 2010, vol. 10, pp. 632–644. ISSN: 1474-1741.
116. DING, S.-W., VOINNET, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. In: *Cell*. 2007, vol. 130, pp. 413–426. ISSN: 1097-4172.
117. DODDS, P.N., RATHJEN, J.P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. In: *Nat. Rev. Genet*. 2010, vol. 11, pp. 539–548. ISSN: 1471-0064.
118. DOLL, H., ANDERSEN, B. Preparation of barley storage protein, hordein, for analytical sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. In: *Analytical Biochemistry*. 1981, vol. 115, pp. 61-66. ISSN: 1096-0309 (web).
119. DONG, N., WANG, LI-RONG et al. Solubility of the high-lysine component of hordein A. In: *Acta Botanica Sinica*. 1989, vol. 31 (9), pp.689-695. ISSN: 1000-4025.
120. DONG, X. NPR1 all things considered. In: *Curr. Opin. Plant Biol*. 2004, vol. 7, pp. 547–552. ISSN: 1369-5266.
121. DONG, X. Pathogen-induced systemic DNA rearrangement in plants. In: *Trends in Plant Science*. 2004, vol. 9, pp. 60-61. ISSN: 1360-1385.
122. DONG, Z., FASULLO, M. Multiple recombination pathways for sister chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae*: role of RAD1 and the RAD52 epistasis group genes. In: *Nucleic Acid Res*. 2003, vol.31, pp.2576-2585. ISSN: 1362-4962.
123. DOONER, H.K, HE, L. Maize genome structure variation: interplay between retrotransposon polymorphisms and genic recombination. In: *Plant Cell*. 2008, vol. 20 (2), pp. 249-58. ISSN: 1040-4651.
124. DRESSLER, D., POTTER, H. Molecular mechanisms in genetic recombination. In: *Annu. Rev. Biochem*. 1982, vol. 51, pp. 727–761. ISSN: 1545-4509 (web).
125. DROUAUD, J., CAMILLERI, C., BOURGUIGNON, P. et al. Variation in *crossing-over* rates across chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* reveals the presence of meiotic recombination "hot spots". In: *Genome Res*. 2006, vol. 16, nr. 1, pp.106-114. ISSN: 1549-5469.
126. DRUGEON, G., JUPIN, I. Stability *in vitro* of the 69K movement protein of Turnip yellow mosaic virus is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. In: *J. Gen. Virol*. 2002, vol. 83, pp. 3187–3197. ISSN: 1465-2099.
127. DRUKA, A. FRANCKOWIAK, J., LUNDQVIST, U. et al. Genetic dissection of barley morphology and development. In: *Plant Physiology*. 2011, vol. 155, pp. 617–627. ISSN: 1532-2548.
128. DUCA, M., PORT, A., TABARA, O. Some aspects of response mechanism of *Helianthus annuus* L. to *Orobanche cumana* Wallr. In: *International congress on oil and protein crops*, Chisinau, Moldova, 20-24 may 2018, p. 129. ISBN: 978-9975-3178-5-6.
129. DUNOYER, P., VOINNET, O. The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. In: *Curr Opin Plant Biol*. 2005, vol. 8, pp. 415–423. ISSN: 1369-5266.
130. EASTMOND, D. A. Siter chromatid exchanges. In: *Encyclopedia of Toxicology*. Wexler P. editor. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2005, pp. 19-20. ISBN: 9780080548005.

131. ECHART-ALMEIDA, C., CAVALLI-MOLINA, S. Hordein polypeptide patterns in relation to malting quality in Brazilian barley varieties. In: *Pesq. agropec. bras.* 2001, vol. 36 (2), pp. 211-217. ISSN: 1678-3921.
132. 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. ISBN 978-3-030-18247-2.
133. EKICI, N. Microsporogenesis, pollen mitosis and pollen tube growth in *Gagea villosa* (Liliaceae). In: *Biologia*. 2014, vol. 69, pp. 1323–1330. E-ISSN: 1336-9563.
134. EL-GHAMERY, A.A., EL-NAHAS, A.I., MANSOUR, M.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. ISSN: 0011-4545.
135. ENTWISTLE, J. Primary structure of a C-hordein gene from barley. In: *Carlsberg Research Communications*, 1988, vol. 53, pp. 247-258. ISSN: 0105-1938.
136. ESNAULT, M.-A., LEGUE, F., CHENAL, C. Ionizing radiation: advances in plant response. In: *Environ Exp. Bot.*, 2010, nr. 68(3), pp. 231-237. ISSN: 0098-8472.
137. FASAHAT, P., RAJABI, A., MAHMOUDI, S.B., NOGHABI, M.A., RAD, J.M. An overview on the use of stability parameters in plant breeding. In: *Biom Biostat Int J*. 2015, vol. 2(5), pp. 149-159. ISSN: 2378-315X.
138. FAULKS, A. J., SHEWRY, P. R., MIFLIN, B. J. The polymorphism and structural homology of storage polypeptides (hordein) coded by the *Hor-2* locus in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Biochem. Genet.* 1981, vol. 19, pp.841-858. ISSN: 1573-4927.
139. FILKOWSKI, J., YEOMAN, A., KOVALCHU, O., KOVALCHUK I. Systemic plant signal triggers genome instability. In: *The Plant Journal*. 2004, vol. 38, pp. 1-11. ISSN: 1365-313X.
140. FORSTERA, B.P., SHU, Q.Y. Plant mutagenesis in crop improvement: basic terms and applications. In: *Plant mutation breeding and biotechnology*, Edited by Q. Y. Shu, B. P. Forster, H. Nakagawa, 2012,608 p., Chapter 1, p. 9. ISBN: 978-178064-085-3.
141. FRANCIS, K.E., LAM, S.Y., HARRISON, B.D. et al. Pollen tetrad-based visual assay for meiotic recombination in *Arabidopsis*. In: *PNAS*. 2007, vol. 104 (10), pp. 3913–3918. E-ISSN: 1091-6490.
142. FRANSZ, P.F., ARMSTRONG, S., de JONG J.H., et al. Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. In: *Cell*. 2000, vol. 100, pp. 367-376. ISBN: 1097-4172.
143. FRASER, R. S. S. Are “Pathogenesis-related” proteins involved in acquired systemic resistance of tobacco plants to Tobacco Mosaic Virus? In: *J. Gen. Virol.* 1982, vol. 5, pp. 305-313. ISSN: 1465-2099 (web).
144. FRENCH, R., STENGER, D.C. Wheat streak mosaic. In: *Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae)*. Lapierre H. and. Signoret P, eds. (Paris INRA), 2004, pp. 602–604. ISBN: 2-7380-1088-1.
145. FRIEDMAN, M. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, vol. 50, pp. 5751–5780. ISSN: 1520-5118.
146. GAO, G., LUO, H. The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. In: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006, vol. 84, pp. 5–14. ISSN: 1205-7541.
147. GARCÍA, C. 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. ISSN: 0033-183X.
148. GARCIA-RUIZ, H. When viruses infect plants. In: *Scientia*. 2019, vol. 123, pp.40–43. ISSN: 2059-898X.

149. GARCIA-RUIZ, H., GARCIA RUIZ, M. T., GABRIEL PERALTA, S. M. et al. Mechanisms, applications, and perspectives of antiviral RNA silencing in plants. In: *Rev Mex Fitopatol.* 2016, vol. 34(3), pp.1-33. ISSN: 2007-8080.
150. GAY, P. A., TUZUN, S. Temporal and spatial assessment of defense responses in resistant and susceptible cabbage varieties during infection with *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. In: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2000, vol. 57, pp. 201–210. ISSN: 0885-5765.
151. GAYRAL, P., NOA-CARRAZANA, J.-C., LESCOT, M. et al. A single Banana streak virus integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. In: *J. Virol.* 2008, vol. 82, pp. 6697-6710. ISSN: 1098-5514.
152. GENDER, R. K., JURKOWSKI, G. I., MCDOWELL, J. M. et al. Signaling pathways that regulate the enhanced disease resistance of *Arabidopsis* “defense, no death” mutants. In: *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008, vol. 21, pp. 1285–1296. ISSN: 0894-0282.
153. GERASKIN, S., OUDALOVA, A., KIM, J. et al. Cytogenetic effect of low dose gamma-radiation in *Hordeum vulgare* seedlings: non-linear dose-effect relationship. In: *Radiation and environmental biophysics.* 2007, vol. 46 (1), pp. 31-41. ISSN: 1432-2099.
154. GERTON, J.L., DERISI, J, SCHROFF, R. et al. Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 2000, vol. 97, pp. 11383-11390. ISSN: 1091-6490.
155. GESTEIRA, A.S., OTONI, W.C., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A. RAPD-based detection of genomic instability in soy-bean plants derived from somatic embryogenesis. In: *Plant Breeding.* 2002, vol. 121, pp. 269-271. ISSN: 0179-9541.
156. GHORBANI, F., ARZANI, A., POURSIABIDI, M.M. Meiotic instability in *Aegilops cylindrica*: a comparison with stable meiosis in *Triticum monococcum* subsp. *aegilopoides*. In: *Caryologia.* 2015, vol. 68, pp. 101–108. ISSN: 0008-7114.
157. GHOSH, A., RUTGERS, T., MANG, K. Q., KAESBERG, P. Characterization of the coat protein mRNA of southern bean mosaic virus and its relationship to the genomic RNA. In: *J. Virol.*, 1981, vol. 39, pp. 87-92. ISSN: 1098-5514.
158. GLINGSTON, R. S., DEB, R., KUMAR, S., NAGOTU, S. Organelle dynamics and viral infections: at cross roads. In: *Microbes and Infection.* 2019, vol. 21(1), pp. 20-32. ISSN: 1286-4579.
159. GOLDBACH, R., LE GALL, O., WELLINK, J. Alpha-like viruses in plants. In: *Seminars in Virology.* 1991, vol. 2, pp. 19-25. ISSN: 1098-1292.
160. GOLDBERG, R.B., BEALS, T.P., SANDERS, P.M. Anther development: basic principles and practical applications. In: *Plant Cell.* 1993, vol. 5(10), pp. 1217-1229. ISSN: 1532-298X.
161. GOLUBOVSKAYA, I.N., HARPER, L.C., PAWLOWSKI, W.P. et al. The *pam1* gene is required for meiotic bouquet formation and efficient homologous synapsis in maize *Zea mays* L. In: *Genetics.* 2002, vol. 162, pp. 1979–1993. ISSN: 1943-2631.
162. GÓMEZ-ARROYO, S., ARMIENTA, M.A., CORTÉS-ESLAVA, J., VILLALOBOS-PIETRINI, R. Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, Mexico. In: *Mutat Res.*, 1997, vol. 394 (1-3), pp.1-7. ISSN: 0027-5107.
163. GOTTSCHALK, W., KAUL, M. L. H. Asynapsis and desynapsis in flowering plants I. Asynapsis. In: *The Nucleus.* 1980, vol. 23(1/2), pp. 1-15. ISSN: 0976-7975.
164. GRAHAM, I.A. Carbohydrate control of gene expression in higher plants. In: *Res Microbiol.* 1996, vol. 147, pp. 572–580. ISSN: 0923-2508.

165. GRELON, M., VEZON, D., GENDROT, G., PELLETIER, G. AtSpo11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. In: *The EMBO Journal*. 2001, vol. 20, pp. 589-600. ISSN: 1460-2075 (web).
166. GUO, T., FANG, Y. Functional organization and dynamics of the cell nucleus. In: *Front Plant Sci*. 2014, vol. 5, pp.1 – 12. ISSN: 1664-462X.
167. GURURANI, M.A., VENKATESH, J., UPADHYAYA, C.P., et al. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. In: *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 2012, vol. 78, pp. 51–65. ISSN: 0885-5765.
168. HAKMAOUI, A., PÉREZ-BUENO, M.L., GARCÍA-FONTANA, B. et al. Analysis of the antioxidant response of *Nicotiana benthamiana* to infection with two strains of *Pepper mild mottle virus*. In: *J. Exp. Bot*. 2012, vol. 63, pp. 5487-5496. ISSN: 1460-2431.
169. HAMIDELDIN, N., HUSSIN, O. Morphological, physiological and molecular changes in *Solanum tuberosum* L. in response to pre-sowing tuber irradiation by gamma rays. In: *Am. J. Food. Nutr*. 2014, nr. 2(1), pp.1-6. ISSN: 2374-1163.
170. HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J. D. G. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. In: *The Plant Cell*. 1996, vol. 8, pp. 1773-1791. ISSN: 1532-298X.
171. HAN, S., YU, B., WANG, Y., LIU, Y. Role of plant autophagy in stress response. In: *Protein Cell*, 2011, vol. 2(10), pp. 784–791. ISSN: 1674-8018.
172. HANDEL, M.A. *Meiosis & Gametogenesis*, Academic Press, 1st edition, 1998, 422 p. ISBN: 9780080584607.
173. HARPER, G., HULL, D., LOCKHART, B., OLSZEWSKI, N. Viral sequences integrated into plant genomes. In: *Annual Review of Phytopathology*. 2002, vol. 40, pp. 119-136. ISSN: 0066-4286.
174. HART, G.E., ISLAM, A., SHEPHERD, K.M. Use of isozymes as chromosome markers in the isolation and characterization of wheat-barley chromosome addition lines. In: *Genet Res*. 1980, vol. 36, pp. 311-325. ISSN: 1469-5073.
175. HAUPT, W., FISCHER, T.C., WINDERL, S., et al. The Centromere 1 (CEN 1) region of *Arabidopsis thaliana*: architecture and functional impact of chromatin. In: *The Plant Journal*. 2001, vol. 27, pp. 285-296. ISSN: 1365-313X.
176. HAVELDA, Z., VARALLYA, Y. E., VALOCZI, A., BURGYN, J. Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. In: *The Plant Journal*. 2008, vol. 55, pp. 278–288. ISSN: 1365-313X.
177. HAWLEY, R.S. Meiosis in living color: Fluorescence-based tetrad analysis in *Arabidopsis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2007, vol. 104 (100), pp. 3673–3674. ISSN: 1091-6490.
178. HAYES, R. J., BUCK, K. W. Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. In: *Cell*. 1990, vol. 63, pp. 363-368. ISSN: 1097-4172 (web).
179. HÉBRARD, E., POULICARD, N., GÉRARD, C., et al. Direct interaction between the Rice yellow mottle virus (RYMV) VPg and the central domain of the rice eIF(iso)4G1 factor correlates with rice susceptibility and RYMV virulence. In: *Mol. Plant Microbe Interact*. 2010, vol. 23, pp. 1506–1513. E-ISSN: 1943-7706.
180. HERNANDEZ, J. A., GULLNER, G., CLEMENTE-MORENO, M. J., KIRALY, L. Oxidative stress and antioxidative responses in plant–virus interactions. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2016, vol. 94, pp. 134-148. ISSN: 0885-5765.
181. HERNÁNDEZ, J.A., RUBIO, M., OLMOS, E. et al. Oxidative stress induced by long-term Plum pox virus infection in peach (*Prunus persica* L. cv. GF305). In: *Physiol Plant*. 2004, vol. 122, pp.486-495. ISSN: 1399-3054.
182. HESLOP-HARRISON J.S. The molecular cytogenetics of plants. In: *Journal of Cell Science*. 1991, vol. 100, pp. 15-21. ISSN: 1477-9137.

183. HESLOP-HARRISON, Y., HESLOP-HARRISON, J., REGER, B. The pollen stigma interaction in the grasses. 7. Pollen-tube guidance and the regulation of tube number in *Zea mays* L. In: *Acta Bot Neerl.* 1985, vol. 34, pp. 193–211. ISSN: 1438-8677.
184. HEYTING, C. Synaptonemal complex: structure and function. In: *Current Opinion in Cell Biology.* 1996, vol. 8, pp. 389-396. ISSN: 0955-0674.
185. HIDALGO A., GONZALEZ-REYES J.A., NAVAS P., GARCIA-HERDUGO G. Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* root induced by protham and chloroprotham. In: *Cytobios.* 1989, vol.57, pp.7-14. ISSN: 0011-4529.
186. HILL, W. G. Quantitative genetics in the genomics Era. In: *Current Genomics*, 2012, nr 13, pp. 196-206. ISSN: 1875-5488.
187. HITCHBORN, J. H., HILLS, G. I. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts. In: *Virology.* 1965, vol. 27, p. 528-540. ISSN: 1098-5514.
188. HOHN, T., HOHN, B., PFEIFFER, P. Reverse transcription in CaMV. In: *Trends in Biochemical sciences.* 1985, vol. 10 (5), pp.205-209. ISSN: 0968-0004.
189. HONYS, D., REŇÁK, D., TWEL, D. Male gametophyte development and function. In: *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology.* 2006, vol. I, pp. 76-87. ISBN-10: 490331300X.
190. <http://ictv.global/report/> (citat 2.11.2019).
191. <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr002.htm> (citat 21.05.2018).
192. <http://sdb.im.ac.cn/vide/descr061.htm> Barley stripe mosaic virus (citat 7.11.2017).
193. <http://sdb.im.ac.cn/vide/descr821.htm> Tomato aspermy virus. (citat 7.11.2017).
194. <http://www.esalq.usp.br/tomato/index.html> (citat 5.10.2018).
195. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=243> Cauliflower mosaic virus. (citat 7.11.2017).
196. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=354> Potato X virus (vizitat 7.11.2017).
197. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=370> Tobacco mosaic virus (citat 7.11.2017).
198. <http://www.q-bank.eu/Virus/> (citat 21.08.2019).
199. <https://www.upov.int/pluto/en/> UPOV. Plant Variety Database (citat 07.04.2017).
200. HUA, Z., VIERSTRA, R. D. The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. In: *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011, vol. 62, pp. 299–334. ISSN: 1543-5008.
201. HULL, R. *Plant viruses.* 5th edition. John Innes Centre, Norwich, UK. 2014. ISBN: 9780123848710.
202. HVID, S., NIELSEN, G. Esterase isoenzyme variants in barley. In: *Hereditas.* 1977, vol. 87, pp. 155-162. ISSN: 1601-5223.
203. IMAI, H., MORIWAKI, K. Re-examination of chiasma terminalization and chiasma frequency in Male Mice. In: *Chromosoma*, 1982, vol. 85, pp. 439-452. ISSN: 1432-0886.
204. IMAI, H.T., WADA, Y., HIRAY, H. et al. Cytological, genetic and evolutionary functions of chiasmata based on chiasma graph analysis. In: *J. Theor. Biol.* 1999, vol. 198, pp. 239-257. ISSN: 1095-8541.
205. IQGAL, M. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring. A review. In: *Cromosphere.* 2016, vol. 144, pp.785-802. ISSN: 0045-6535.
206. ISHIBASHI, K., MASUDA, K., NAITO, S. et al. An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 2007, vol. 104, pp. 13833–13838. ISSN: 1091-6490.
207. ISHIBASHI, K., MAWATARI, N., MIYASHITA, S. et al. (2012). Coevolution and hierarchical interactions of *Tomato mosaic virus* and the resistance gene *Tm-1*. In: *PLoS Pathog.* 2012, 8:e1002975. ISSN: 1553-7374.

208. ISHIHAMA, A., BARBIER, P. Molecular anatomy of viral RNA-directed RNA polymerase. *Archives of Virology*. 1994, vol. 134, pp. 235-258. ISSN: 1432-8798.
209. ISHII, Y., BENDER, M. Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. In: *Mutat. Res.* 1980, vol. 79, pp. 19–32. ISSN: 1383-5718.
210. IVANOV, K., ESKELIN, K., LOHMUS, A., MAKINEN, K. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. In: *J Gen Virol*. 2014, vol. 95, pp. 1415–1429. ISSN: 1465-2099.
211. JACKSON, A. O., LIM, H.-S., BRAGG, J. et al. Hordeivirus Replication, Movement, and Pathogenesis. In: *Annual Review of Phytopathology*, 2009, vol. 47, p. 385-422. ISSN: 0066-4286.
212. JENSEN, B. H., MASSOMO, S. M. S., SWAI, I. S. et al. Field evaluation for resistance to the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage (*Brassica oleracea*). In: *European Journal of Plant Pathology*, 2005, vol. 113 (3), pp. 297-308. ISSN: 1573-8469.
213. JOHN, B. *Meiosis*. Cambridge University Press, Cambridge. 1990, pp. 103-303. ISBN: 9780511565076.
214. JOHRI, B. M., SRIVASTAVA, P. S. *Reproductive biology of plants*. Ed. Johri B. M., Srivastava P. S. Springer, 2001. 331p. ISBN: 9788173193255.
215. JONES, J. D., DANGL, J. L. The plant immune system. In: *Nature*. 2006, vol. 444, pp. 323–329. ISSN: 1476-4687(web).
216. JOST, L. K., BERTULAT, B., CARDOSO, C. M. Heterochromatin and gene positioning: inside, outside, any side? In: *Chromosoma*. 2012, vol. 121 (6), pp. 555–563. ISSN: 1432-0886.
217. KAEPLER, S. M., KAEPLER, H. F., RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. In: *Plant Mol. Biol.* 2000, vol. 43, pp.179-188. ISSN: 1573-5028.
218. KAHLER A. L., ALLARD R. W. Genetics of isozyme variants in barley. I. Esterases. In: *Crop Sci.* 1970, vol. 10, pp. 444-448. ISSN: 1435-0653
219. KALENDAR, R., ANTONIUS, K., SMÝKAL, P., SCHULMAN, A. H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. In: *Theoretical and Applied Genetics*. 2010, vol. 121 (8), pp. 1419-1430. ISSN: 14322242.
220. KANG, B. C., YEAM, I., JAHN, M. M. Genetics of plant virus resistance. In: *Annual Rev. Phytopathol.* 2005, vol. 43, pp. 581–621. ISSN: 0066-4286.
221. KAO, F. I., CHENG, Y. Y., CHOW, T. Y. An integrated map of *Oryza sativa* L. chromosome 5. In: *Theor. Appl. Genet.* 2006, vol. 112, pp. 891-902. ISSN: 1432-2242.
222. KASUGA, T., GIJZEN, M. Epigenetics and the evolution of virulence. In: *Trends in Microbiology*. 2013, vol. 21 (11), pp. 575-582. ISSN: 1878-4380.
223. KATHIRIA, P., SIDLER, C., GOLUBOV, A., et al. Tobacco mosaic virus infection results in an increase in recombination frequency and resistance to viral, bacterial, and fungal pathogens in the progeny of infected tobacco plants. In: *Plant Physiol.* 2010, vol 153, pp.1859-1870. ISSN: 1532-2548.
224. KATO, H. Mechanisms of sister chromatid exchanges and the relation to production of chromosomal aberrations. In: *Chromosoma*, 1977, vol.59, pp.179–191. ISSN: 1432-0886.
225. KAUPPI, L., JEFFREYS, A.J., KEENEY, S. Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. In: *Nat. Rev. Genet.* 2004, vol. 5, pp. 413-424. ISSN: 1471-0064.
226. KAUR, D., SINGHAL, V. K. Chromosome number, meiosis and pollen fertility in *Vicia rigidula* Royle and *V. tenera* Grah. from cold desert regions of India. In: *Cytologia*. 2010, vol. 75, pp. 9–14. ISSN: 0011-4545.

227. KEENEY, S. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. In: *Current Topics in Developmental Biology*. 2010, vol. 52, pp. 1-53. ISSN: 0070-2153.
228. KENDE H., ZEEVAART, J. A. D. The five “classical” plant hormones. In: *The Plant Cell*, 1997, vol. 9, pp. 1197-1210. ISSN: 1532-298X.
229. KHAN, J. A., DIJKSTRA, J. (eds). *Plant viruses as molecular pathogens*. Haworth Press Inc., 2002, 530 p. ISBN 1 56022 894 6.
230. KHORA, S. S., PANDA, K. K., PANDA, B. B. Genotoxicity of tetrodotoxin from puffer fish tested in root meristem cells of *Allium cepa* L. In: *Mutagenesis*. 1997, vol. 12 (4), pp. 265-269. ISSN: 1464-3804.
231. KIHLMAN, B. A., KRONBORG, D. Sister chromatid exchange in *Vicia faba*. I. demonstration by a modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique. In: *Chromosoma*, 1975, pp. 1-10. ISSN: 1432-0886.
232. KITAJIMA, E. W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). In: *Biota Neotropica*, 2020, vol. 20(2): e20190932, ISSN 1676-0611.
233. KLEIN, S., ZENVIRTH, D., DROR, V. et al. Patterns of meiotic double-strand breakage on native and artificial yeast chromosomes. In: *Chromosoma*. 1996, vol. 105, pp. 276-284. ISSN: 1432-0886.
234. KLENERMAN, P., HENGARTER, H., ZINKERNAGEL, R. M. A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. In: *Nature*. 1997, vol. 390 (6657), pp. 298-301. ISSN: 1476-4687(web).
235. 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. ISSN: 1365-3059.
236. 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, nr. 5, pp. 821-827. ISSN: 1471-9053.
237. 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. E-ISSN: 1545-7885.
238. KØRNER, C. J., KLAUSER, D., NIEHL, A. et al. The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. In: *Mol. Plant Microbe Interact*. 2013, vol. 26, pp. 1271–1280. ISSN: 0894-0282.
239. KOROL, A. B., PREYGEL, I. A., PREYGEL, S. I. *Recombination variability and evolution. Algorithms of estimation and population-genetic models*. Chapman & Hall, London. 1994. 362 p. ISBN: 978-0-412-49410-9.
240. KOVALCHUK, I., KOVALCHUK, O., KALCK, V. Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. *Nature* (Lond.). 2003, vol. 423, pp. 760-762. ISSN: 1476-4687(web).
241. KUNG, Y. J., LIN, P. C., YEH, S. D. Genetic analyses of the FRNK motif function of Turnip mosaic virus uncover multiple and potentially interactive pathways of cross-protection. In: *Mol Plant Microbe Interact*. 2014, vol. 27, pp. 944–955. E-ISSN: 1943-7706.
242. LAGERCRANTZ, U., LYDIATE, D. J. RFLP mapping in *Brassica nigra* indicates differing recombination rates in male and female meiosis. In: *Genome*, 1995, vol. 38, pp. 255-264. ISSN: 0831-2796.
243. LAKATOS, L., CSORBA, T., PANTALEO, V. et al. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. In: *The EMBO J*. 2006, vol. 25, pp. 2768–2780. ISSN: 1460-2075 (web).
244. LALIBERTE, J. F., SANFACON, H. Cellular remodeling during plant virus infection. In: *Annu Rev Phytopathol*. 2010, vol. 48, pp. 69–91. ISSN: 0066-4286.

245. LALIBERTE, J-F., ZHENG, H. Viral manipulation of plant host membranes. In: *Annual Review of Virology*. 2014, vol. 1, pp.237-259. E-ISSN: 2327-0578.
246. LAM, I., KEENEY, S. Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. In: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2014, vol. 7 (1), pp. 1-24. ISSN: 1943-0264.
247. LANDIS, W. G., GORSUCH, J. W., HUGHES, J. S., ANTHONY, M. L. *Environmental toxicology and risk assessment*. Vol.2. Ed.Gorsuch, Dwyer, Ingersoll, La Point, 1993, 744p. ISBN: 080312886X.
248. LANFERMEIJER, F. C., DIJKHUIS, J., STURRE, M.J.G. et al. 2003. Cloning and characterization of the durable *Tomato mosaic virus* resistance gene *Tm-2²* from *Lycopersicon esculentum*. In: *Plant Mol. Biol.* 2003, vol. 52, pp. 1039–51. ISSN: 1573-5028.
249. LARKIN, P., SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. In: *Theor. Appl. Genet.* 1981, vol. 60, pp. 197-214. ISSN: 1432-2242.
250. LARKIN, P. J. Somaclonal variation, history, method and meaning. In: *Iowa State J. Res.* 1987, vol. 61 (4), pp. 393–434. ISSN: 0092-6345.
251. LAVIA, P., MILEO, A. M., GIORDANO, A., PAGII, M. G. Emerging roles of DNA tumor viruses in cell proliferation: new insights into genomic instability. In: *Oncogene*. 2003, vol. 22, pp. 6508-6516. ISSN: 0950-9232.
252. LEFEUVRE, P., MARTIN, D. P., ELENA, S. E, et al. Evolution and ecology of plant viruses. In: *Nature Reviews Microbiology*, 2019, vol. 17, pp. 632–644. ISSN 1740-1534.
253. LEFKOWITZ, E. J., DEMPSEY, D. M., HENDRICKSON, R. et al. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). In: *Nucleic Acids Research*, 2017, gkx932. ISSN: 1362-4962.
254. LEU, J. Y., CHUA, P. R., ROEDER, G. S. The meiosis-specific Hop2 protein of *S. cerevisiae* ensures synapsis between homologous chromosomes. In: *Cell*. 1998, vol. 94, pp. 375–386. ISSN: 1097-4172.
255. LI, F., PIGNATTA, D., BENDIX, C. et al. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2012, vol. 109, pp. 1790–1795. ISSN: 1091-6490.
256. LI, G., YUN, Y., LI, H. SANG, N. Effect of landfill leachate on cell cycle, micronucleus, and sister chromatid exchange in *Triticum aestivum*. In: *J. Hazard Mater.* 2008, vol. 155, nr. 1-2, pp.10-16. ISSN: 0304-3894.
257. LI, J., DUKOWIC-SCHULZE, S., LINDQUIST, I.E. 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. ISSN: 1365-313X.
258. LI, Z., BURRITT, D.J. The influence of Cocksfoot mottle virus on antioxidant metabolism in the leaves of *Dactylis glomerata* L. In: *Physiol Mol Plant Pathol*. 2003, vol. 62, pp. 285–295. ISSN: 0885-5765.
259. LICHTEN, M. Meiotic recombination: breaking the genome to save it. In: *Curr. Biol*. 2001, vol. 11, pp. 253-256. ISSN: 0960-9822.
260. LIM, H.-S., BRAGG, J. N., GANESAN, U. et al. Subcellular localization of the *Barley stripe mosaic virus* triple gene block proteins. In: *J. Virol.* 2009, vol. 83, pp. 9432–9448. ISSN: 1098-5514.
261. LINDE-LAURSEN, I., SIDDIQUI, K. A. Triploidy and aneuploidy in virus infected wheat, *Triticum aestivum*. In: *Hereditas*. 1974, vol. 76(1), pp. 152-154. ISSN: 0018–0661.
262. LINTHORST, H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. In: *CRC Cri Rev Plant Sci*. 1991, vol. 10, pp. 123-150. ISSN: 0735-2689.

263. LIU, H. F., KIRCHOFF, B. K., WU, G. J., LIAO, J. P. Microsporogenesis and male gametogenesis in *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). In: *Bull Torrey Bot Club*. 2007, vol. 134, pp. 335–343. ISBN: 0331348136.
264. LIU, N., LIN, Z., GUAN, L. et al. Antioxidant enzymes regulate reactive oxygen species during pod elongation in *Pisum sativum* and *Brassica chinensis*. In: *PLoS One*. 2014, 9(2):e87588. ISSN: 1544-9173.
265. LIU, P. P., BHATTACHARJEE, S., KLESSIG, D. F., MOFFETT, P. Systemic acquired resistance is induced by R gene-mediated responses independent of cell death. In: *Mol. Plant Pathol.* 2010, vol. 11, pp. 155–160. ISSN: 1464-6722.
266. LIU, Q., GUNTUKU, S., CUI, X.S. et al. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. In: *Genes Dev.* 2000, vol.14, nr. 12, pp. 1448-1459. ISSN: 1549-5477.
267. LIU, Y., SCHIFF, M., SERINO, G. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. In: *The Plant Cell*. 2002, vol. 14, pp. 1483–1496. ISSN: 1532-298X.
268. LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. In: *Methods*. 2001, vol. 25 (4), pp. 402-408. ISSN: 1095-9130.
269. LOEBENSTEIN, G. Local lesions and induced resistance. In: *Adv. Virus Res.* 2009, vol. 75, pp. 73–117. ISSN: 0065-3527.
270. LOIDL, J., KLEIN, F., SCHERTHAN, H. Homologous pairing is reduced but not abolished in asynaptic mutants of yeast. In: *Journal of Cell Biology*. 1994, vol. 125, pp. 1191-1200. ISSN: 0171-9335.
271. LOVE, A. J., YUN, B. W., 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. ISSN: 1532-2548.
272. LUCHT, J. M., MAUCH-MANI, B., STEINER, H. Y. Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. In: *Nature Genetics*. 2002, vol. 30, pp. 311-314. ISSN: 1546-1718.
273. LUKASIK, E., TAKKEN, F. L. W. STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009, vol. 12, pp. 427–436. ISSN: 1369-5266.
274. LUKENS, L. N., ZHAN, S. The plant genomes methylation status and the response to stress: implications for plant improvement. In: *Current Opinion in Plant Biology*. 2007, vol. 10, pp. 317-322. ISSN: 1369-5266.
275. LYLES, D. S. Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNAviruses. In: *Mol. Biol. Rev.*, 2000, vol. 64 (4), pp. 709–724. ISSN: 1098-5557.
276. LYNCH, M., WALSH, B. *Genetic and analysis of quantitative traits*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 1998, 980 p. (36p). ISBN: 978-0878934812.
277. LYNN, A., ASHLEY, T., HASSOLD, T. Variation in human meiotic recombination. In: *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2004, vol. 5, pp. 317–349. ISSN: 1527-8204.
278. MA, X., NICOLE, M. C., METEIGNIER, L. V. et al. Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. In: *Journal of Experimental Botany*. 2015, vol. 66, pp. 919–932. ISSN: 0022-0957.
279. MACKAY, T. F. C., STONE, E. A., AYROLES, J. F. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. In: *Nature Reviews Genetics*, 2009, vol. 10, pp. 565–577. ISSN: 1471-0064.
280. MADHUSUDHAN, K.N., SRIKANTA B.M., SHYLAJA M.D. et al. Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible

- and incompatible host-tobamovirus interaction. In: *J Plant Interact.* 2009, vol. 4, pp.157–166. ISSN: 1742-9153.
281. MADLUNG, A., COMAI, L. The effect of stress on genome regulation and structure. In: *Ann. Bot.* 2004, vol. 94, pp. 481–495. ISSN: 1095-8290.
 282. MALUSZYNSKA J., JUCHIMIUK J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. In: *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 2005, vol. 56, pp. 177-184. ISSN: 0004-1254.
 283. MANDADI, K. K., SCHOLTHOF, K. B. Plant immune responses against viruses: How does a virus cause disease? In: *The Plant Cell*, 2013, vol. 25, pp. 1489–1505. ISSN: 1532-298X.
 284. MANDADI, K. K., SCHOLTHOF, K.-B. G. Characterization of a viral synergism in the monocot *Brachypodium distachyon* reveals distinctly altered host molecular processes associated with disease. In: *Plant Physiol.* 2012, vol. 160, pp. 1432–1452. ISSN: 1532-2548.
 285. MARALAPPANAVAR, M. S., KURUVINASHETTI, M. S., HARTI, C. C. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. In: *Euphytica*. 2000, vol. 115, pp. 173-180. ISSN: 0014-2336.
 286. MARI, L., ANDRONIC, L., CUPCEA, I. Histochemical evaluation of hydrogen peroxide and α tomatine in tomato plants with different defense responses to virus infection. In: *Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции сельскохозяйственных растений. V Международная научно-методологическая конференция, Москва, 2019, том II*, сс. 22-25. ISBN: 978-5-209-09359.
 287. MARI, L., CHIRIAC, Gh. The role of viral Infection in inducing variability in virus-free progeny in tomato. In: *Journal of Integrative Plant Biology*. 2009, vol. 51, nr. 5, pp. 476–488. ISSN: 1672-9072.
 288. MATHEW, T. O., KURIACHAN, P. Cytological Studies of *Solanum jasminoides* Paxt. var. *grandiflorum* Hart. In: *Cytologia*. 1989, vol. 54, pp. 661-666. ISSN: 0011-4545.
 289. MAULE, A., LEH, V., LEDERER, C. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. In: *Curr Opin Plant Biol.* 2002, vol. 5, pp. 279–284. ISSN: 1369-5266.
 290. McCARTNEY, A. W., GREENWOOD, J. S., FABIAN, M. R. Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. In: *The Plant Cell*. 2005, vol. 17, pp. 3513–3531. 1532-298X.
 291. McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. In: *Sciences*. 1984, vol. 226, pp.792-801. ISSN: 0968-0004.
 292. MERCIER, R., ARMSTRONG, S. J., HORLOW, CH. The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis*. In: *Development*. 2003, vol. 130, nr. 14, pp. 3309-3318. ISSN: 1477-9129.
 293. MEZARD, C. Meiotic recombination hotspots in plants. In: *Biochemical Society Transactions*, 2006, vol. 34 (part 4), pp. 531-534. ISSN: 0300-5127.
 294. MIFLIN, B. J., SHEWRY, P. R. An introduction to the extraction and characterization of barley and maize proteins. In: *Techniques for the separation of barley and maize proteins*. Miflin B. J.; Shewry P. R (Ed.). Luxembourg: Commission of the European Communities, 1977. p. 13-25.
 295. MILNE, R. G., LESEMANN, D.-E. Immunosorbent electron microscopy in plant virus studies. In: *Methods in Virology*. 1984, vol. 8, pp. 85-101. ISBN 0-12-470208-2.
 296. MISE, K., POCSAI, E. Brome mosaic. In: *Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae)*. Lapierre H. and Signoret P., eds (Paris INRA), 2004. pp. 735–739. ISBN: 157808377X.

297. 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. ISSN: 1464-3804.
298. MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. In: *Trends in Plant Sci.* 2004, vol. 9 (10), pp. 490-498. ISSN: 1360-1385.
299. MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. In: *Trends in Plant Sci.* 2002, vol. 7(9), pp. 405-410. ISSN: 1360-1385.
300. MOCHIZUKI, T., OGATA, Y., HIRATA, Y., OHKI, S. T. Quantitative transcriptional changes associated with chlorosis severity in mosaic leaves of tobacco plants infected with Cucumber mosaic virus. In: *Molecular Plant Pathology*, 2014, vol. 15 (3), pp. 242-254. ISSN: 1364-3703.
301. MOCK, R. J., STOKES, I. E., JULLESFIE, A. J. Effect of sugarcane mosaic virus infection in parental stock on panicle and seed production of virus-free F₂ progeny in Sorghum (*Sorghum bicolor*). In: *Plant Disease*. 1985, vol. 69, nr. 4, pp. 310-312. ISSN: 0191-2917.
302. MOENS, P. B., PEARLMAN, R. E. Probing pachytene chromosomes. In: *Chromosome*. Heslop-Harrison J.S., Flavell R.B., eds. Oxford: Bios, 1993. pp. 183-192. ISBN: 9780632054077.
303. MOENS, P.B. Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. In: *BioEssays*. 1994, vol. 16, pp. 101-106. ISSN: 0265-9247.
304. MOFFETT, P. Mechanisms of recognition in dominant *R* gene mediated resistance. In: *Adv. Virus Res.* 2009, vol. 75, pp. 1–33. ISSN: 0065-3527.
305. MOHMAND, A. S., NABORS, M. W. Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes. In: *Plant Cell. Rep.* 1990, vol. 8, pp. 558-560. 1532-298X.
306. MOLINIER, J., RIES, G., ZPFEL, C., HONHN, B. Transgenerational memory of stress in plants. In: *Nature*. 2006, vol. 442, pp.1046-1049. ISSN: 1476-4687(web).
307. MORGAN, D. Meiosis. *The Cell Cycle: Principles of Control*. Chapter 9. London: New Science Press Ltd. 2007. ISBN: 0-87893-508-8.
308. MOTTINGER, J., JOHNS, M., FREELING, M. Mutations of the *Adh1* gene in maize following infection with barley stripe mosaic virus. In: *MGG Molecular and General Genetics*. 1984, vol. 195, pp. 367–369. ISSN: 1617-4623.
309. MOTTINGER, J. P., DELLAPORTA, S. L., KELLER, P. B. Stable and unstable mutations in *Aberrant Ratio* stocks of maize. In: *Genetics*. 1984, vol. 106, pp. 751-767. ISSN: 1943-2631.
310. MOURY, B., VERDIN, E. Viruses of pepper crops in the mediterranean basin: a remarkable stasis. In: *Adv. Virus Res.* 2012, vol. 84, pp. 127–162. ISSN: 0065-3527.
311. MUR, L. A. J., KENTON, P., LLOYD, A. J. et al. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? In: *J. Exp. Bot.* 2008, vol. 59, pp. 501–520. ISSN: 1460-2431.
312. MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. In: *Physiol Plant*. 1962, vol. 15, pp. 473-497. ISSN: 1399-3054.
313. MYSORE, K. S., RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? In: *Trends Plant Sci.* 2004, vol. 9, pp. 97–104. ISSN: 1360-1385.
314. NABESHIMA, K., KAKIHARA, Y., HIRAOKA, Y., NOJIMA, H. A novel meiosis-specific protein of fission yeast, *Meu13p*, promotes homologous pairing independently of homologous recombination. In: *The Embo J.* 2001, vol. 20, pp. 3871–3881. ISSN: 1460-2075.

315. NAGAR, S., HANLEY-BOWDOIN, L., ROBERTSON, D. Host DNA Replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. In: *The Plant Cell*. 2002, vol. 14, p.2995-3007. ISSN: 1532-298X.
316. NAVAS-CASTILLO, J., CABRERO, J., CAMACHO, J. P. M. Chiasma redistribution in bivalents carrying supernumerary chromosome segments in grasshoppers. In: *Heredity*. 1985, vol. 55, pp. 245-248. ISSN: 0022-1503.
317. NETSVETAEV, V.P. Specific aspect of detection of peroxidase isozymes and their genetic control in barley. In: *Russian Journal of Genetics*. 2008, vol. 44, pp. 1121-1122. ISSN: 1608-3369.
318. NETSVETAEV, V.P. Location on barley chromosome 1 of the loci Est 1 and Est 2, coding esterases 1 and 2. In: *Barley Genetics Newsletter*. 1992, vol. 21, pp. 63-66. ISSN: 1043-5174.
319. NEVO, E., BEILES, A., STORCH, N. Microgeographic edaphic differentiation in hordein polymorphisms of wild barley. In: *Theoretical and Applied Genetics*. 1983, vol. 64, pp. 123-132. ISSN: 0040-5752.
320. NEZAMES, C.D., DENG, X.-W. The COP9 signalosome: Its regulation of cullin-based E3 ubiquitin ligases and role in photomorphogenesis. In: *Plant Physiol*. 2012, vol. 160, pp. 38–46. ISSN: 1532-2548.
321. NISHI, Y., HASEGAWA, M.M., INUI, N. et al. Effect of post-treatment with aphidicolin – a specific inhibitor of DNA polymerase α on sister-chromatid exchanges induced by ethyl methanesulfonate. In: *Mutat. Res*. 1982, vol. 103, pp. 155–159. ISSN: 0921-8777.
322. NONOMURA, K.-I., NAKANO, M., FUKUDA, T., et al. The novel gene *HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1* of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. In: *The Plant Cell*. 2004, vol. 16, pp. 1008-1020. ISSN: 1532-298X.
323. NOVIA, R., LENNARZ, W. J. Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. In: *J. Biol. Chem*. 1992, vol. 267, pp. 3553-3556. ISSN: 1083-351X.
324. NUTTER, F. W., PEDERSON, V. D., TIMIAN, R. G. Relationship between seed infection by barley stripe mosaic virus and yield loss. In: *Phytopathology*. 1984, vol.74, nr. 3, p. 363–366. ISSN: 0031-949X.
325. O'BRIEN, J. A., DAUDI, A., BUTT, V. S., BOLWELL, G. P. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. In: *Planta*. 2012, vol. 236, pp. 765–779. ISSN: 0032-0935.
326. OHKURA, H. Meiosis: An overview of key differences from mitosis. In: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2015, vol. 7 (5), pp.1-14. ISSN: 1943-0264.
327. OSSOWSKI S., SCHNEEBERGER K., LUCAS-LLEDO, J. I. The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. In: *Science*. 2010, vol. 327, pp. 92–94. ISSN: 0968-0004.
328. OTULAK, K., KOZIEŁ, E., GARBACZEWSKA, G. “Seeing is believing”. The use of light, fluorescent and transmission electron microscopy in the observation of pathological changes during different plant – virus interactions. In: *Microscopy: advances in scientific research and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.). Formatex Microscopy Series № 6, 2014, vol. 1, pp. 367- 376. ISBN: 978-84-942134-2-7.
329. PADMANABHAN, M. S., DINESH-KUMAR, S. P. All hands on deck-the role of chloroplasts, endoplasmic reticulum, and the nucleus in driving plant innate immunity. In: *Mol. Plant Microbe Interact*. 2010, vol. 23, pp. 1368–1380. ISSN: 0894-0282.
330. PAINTER, R. B. A replication model for sister-chromatid exchange. In: *Mutat. Res*. 1980, vol. 70, pp. 337-341. ISSN: 1873-135X.

331. PALLAS, V., GARCIA, J. A. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. In: *Journal of General Virology*. 2011, vol. 92, pp. 2691–2705. E-ISSN: 1465-2099.
332. PANAVALAS, T., SERVIENE, E., BRASHER, J., NAGY, P. D. Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2005, vol. 102, pp. 7326–7331. ISSN: 1091-6490.
333. PANDA, K. K., PATRA, J., PANDA, B. B. Induction of sister chromatid exchanges by heavy metals salts in root meristem cells of *Allium cepa*. In: *Biol. Plantarum*. 1996, vol. 38, pp. 555–561. ISSN: 1573-8264.
334. PANDEY, R. M. Cytotoxic effects of pesticides in somatic cells of *Vicia faba* L. In: *Цитология и генетика*. 2008, nr. 6, pp. 13–18. ISSN: 0564-3783.
335. PARK, M. R. JEON, R. D., KIM, K. H. Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants. In: *Front Plant Sci.*, 2014, vol. 5, art. 60, pp. 1–12. eCollection 2014. ISSN: 1664-462X.
336. PASANTES, J. J., MARTINEZ-EXPOSITO, M. J., TORREIRO, A., MENDEZ, J. The sister chromatid exchange test as an indicator of marine pollution: some factors affecting SCE frequencies in *Mytilus galloprovincialis*. In: *Marine Ecology Progress Series*. 1996, vol. 143, pp. 113–119. ISSN: 0171-8630.
337. PATNAIK, J., SAHOO, S., DEBATA, B. K. Somaclonal variation in cell suspension culture-derived regenerants of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia*. In: *Plant Breeding*. 1999, vol. 118, pp. 351–354. ISSN: 0179-9541.
338. PAWLOWSKI, W. P., GOLUBOVSKAYA, I. N., TIMOFEJEVA, L. et al. Coordination of meiotic recombination, pairing, and synapsis by PHS1. In: *Science*. 2004, vol. 303, pp. 89–92. ISSN: 0968-0004.
339. PEDLEY, K. F., MARTIN, G. B. Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005, 8, pp. 541–547. ISSN: 1369-5266.
340. PFEIFFER, P., HOHN, T. Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: A detailed model and test of some aspects. In: *Cell*. 1983, vol. 33, pp. 781–789. ISSN: 1097-4172.
341. PODEVIN, N., DU JARDIN, P. Possible consequences of the overlap between the CaMV 35S promoter regions in plant transformation vectors used and the viral gene VI in transgenic plants. In: *GM Crops Food*. 2012, vol. 3 (4), pp. 296–300. ISSN: 2164-5701.
342. PRIMIG M., WILLIAMS R.M., WINZELER E.A. et al. The core meiotic transcriptome in budding yeasts. In: *Nature Genetics*. 2000, vol. 26, pp. 415–423. ISSN: 1546-1718.
343. PROD'HOMME, D., LE PANSE, S., DRUGEON, G., JUPIN, I. Detection and subcellular localization of the Turnip yellow mosaic virus 66K replication protein in infected cells. In: *Virology*. 2001, vol. 281, pp. 88–101. ISSN: 0042-6822.
344. QIAN, XIAO-WEI. Mutagenic effects of chromium trioxide on root tip cells of *Vicia faba*. In: *Journal of Zhejiang University Science*. 2004, vol. 5, nr. 12, pp. 1570–1576. ISSN: 1009-3095.
345. QUTOB, D., CHAPMAN, B. P., GIJZEN, M. Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. In: *Nat. Commun.* 2013, no. 4, pp. 1349–1354. ISSN: 2041-1723.
346. RAKOCZY-TROJANOWSKA, M. The effect of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomical traits. In: *Cell Mol. Biol.* 2002, no. 7, pp. 1111–1120. E-ISSN: 1165-158X.
347. RAPOSO, A., CARVALHO, C. R., OTONI, W. C. Statistical and image analysis of sister chromatid exchange in maize. In: *Hereditas*. 2004, vol. 141 (3), pp. 318–322. ISSN: 0018-0666.

348. RECHINGER, K. B., BOUGRI, O. V., CAMERON-MILLS, V. Evolutionary relationship of the members of the sulphur-rich hordein family revealed by common antigenic determinants. In: *Theor Appl Genet*, 1993, vol. 85, pp. 829-840. ISSN: 0040-5752.
349. REES, H., DALE, P. I. Chiasmata and variability in *Lolium* and *Festuca* population, In: *Chromosoma*. 1974, vol. 17, pp. 335-351. ISSN: 1432-0886.
350. REICHEL, C., BEACHY, R.N. Degradation of Tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. In: *J. Virol.* 2000, vol. 74, pp. 3330–3337. ISSN: 0022-538X.
351. REMANS, T., IRAM, S., SHUEY, L. et al. Banana streak virus: a highly diverse plant pararetrovirus. In: *Plant Viruses*. 2007, vol. 1 (1), pp. 33-38. ISSN: 1749-6209.
352. RIEDLE-BAUER, M. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. In: *J Phytopathol*. 2000, vol. 148, pp. 297–302. ISSN: 1439-0434.
353. RODRÍGUEZ-REYES, R., MORALES-RAMÍREZ, P. Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of sister chromatid exchange induction by ENU and the role of BrdU. In: *Mutagenesis*. 2003, vol. 18 (1), pp. 65-72. ISSN: 02678357.
354. ROEDER, G. S. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. In: *Genes and Development*. 1997, vol. 11, pp. 2600-2621. ISSN: 0890-9369.
355. ROGAKOU, E. P., BOON, C., REDON, C., BONNER, W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. In: *J. Cell. Biol.* 1999, vol. 146, no. 5, pp. 905-916. ISSN 0021-9525.
356. RUDD M. K., FRIEDMAN C., PARGHI S. S. et al. Elevated rates of sister chromatid exchange at chromosome ends. In: *PLoS Genetic*. 2007, vol. 3 (2), e32. ISSN: 1553-7404.
357. RYAN, S. A., LARKIN, P. J., ELLISON, F. W. Somaclonal variation in some agronomic and dualitiz characters in wheat. In: *Theor. Appl. Genet*. 1987, vol. 74, pp. 77-82. ISSN: 1432-2242.
358. SACCO, M. A., KOROPACKA, K., GRENIER, E. et al. The cyst nematode SPRYSEC protein RBP-1 elicits Gpa2 and RanGAP2 dependent plant cell death. In: *PLoS Pathog*. 2009, 5:e1000564. ISSN: 1553-7366.
359. SALVI, S., TUBEROSA, R. The crop QTLome comes of age. In: *Current Opinion in Biotechnology*. 2015, vol. 32, pp. 179-185. ISSN: 0958-1669.
360. SANCHEZ-MORAN, E., ARMSTRONG, S. J. Meiotic chromosome synapsis and recombination in *Arabidopsis thaliana*: new ways of integrating cytological and molecular approaches. In: *Chromosome Res*. 2014, vol. 22 (2), pp. 179-190. ISSN: 0967-3849.
361. SANDFAER, J. Barley stripe mosaic virus and the frequency of triploids and aneuploids in barley. In: *Genetics*. 1973, vol. 73, pp. 597-603. ISSN: 1943-2631.
362. 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. ISSN: 0921-8777.
363. SANG, N., XIN, X. Municipal landfill leachate induces cytogenetic damage in root tips of *Hordeum vulgare*. In: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2006, vol. 63, no. 3, pp. 469-473. ISSN: 0147-6513.
364. SAPOTSKY, M.V., ROMANOVA, S.A., POLYACOVA, A.M., MALINOVSKY, V.I. The correlation between severity of disease symptoms and the accumulation of viral antigen and acidic pathogenesis-related proteins in the leaves of thorn-apple plants infected with different isolates of Potato virus X. In: *Journal of Phytopathology*. 2005, vol. 153 (7-8), pp. 440-444. ISSN: 1439-0434.
365. SATOH, K., KONDOH, H., DE LEON, T.B. 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. ISSN: 1872-7492.

366. SAUNDERS, K., LUCY, A. P., COVEY, S. N. Susceptibility of *Brassica* species to cauliflower mosaic virus infection is related to a specific stage in the virus multiplication cycle. In: *Journal of General Virology*. 1990, vol. 71, pp.1641-1647. E-ISSN: 1465-2099.
367. SAYANOVA, O., POMORTSEV, A., LADOGINA, M. et al. Analysis of C-hordein deficient mutants of barley. In: *Barley genetics newsletter*. 1993, vol. 22, pp. 53-56. ISSN: 1043-5174.
368. SCHNEIDERMAN, M.H., DEWEY, W.C., HIGHFIELD, D.P. Inhibition of DNA synthesis in synchronized chinese hamster cell treated in G1 with cycloheximide. In: *Exp Cell Res*. 1971, vol. 67, pp. 147–155. ISSN: 0014-4827.
369. SCHOLTHOF, K.B., ADKINS, S., CZOSNEK, H. et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. In: *Mol. Plant Pathol*. 2012, vol. 12 (9), pp. 938-954. ISSN: 0885-5765.
370. SCHOMMER, C., BEVEN, A., LAWRENSON, T. et al. AHP2 is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in *Arabidopsis* meiosis. In: *The Plant Journal*, 2003, vol. 36, pp.1-11. ISSN: 1365-313X.
371. SCHUERMAN, D., MOLINIER, J., FRITSCH, O., HOHN, B. The dual nature of homologous recombination in plants. In: *TRENDS in Genetics*. 2005, vol. 21, no.3, pp. 172-181. ISSN: 0168-9525.
372. SCHWARZACHER, T. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent *in situ* hybridization data in plants. In: *Journal of Experimental Botany*. 2003, vol. 54 (380), pp.11-23. ISSN: 0022-0957.
373. SESTACOVA, T., PORT, A., DUCA, M. Identification of genes differentially expressed in sunflower during interaction with *Plasmopara Halstedii*. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2015, nr. 3 (327), pp. 83-89. ISSN: 1857-064X.
374. SETTLAGE, S. B., MILLER, A. B., GRUISSEM, W., HANLEY-BOWDOIN, L. Dual interaction of a geminivirus replication accessory factor with a viral replication protein and a plant cell cycle regulator. In: *Virology*. 2001, vol. 279, issue 2, pp. 570-576. ISSN: 0042-6822.
375. SHA, A. H., LIN, X. H., HUANG, J. B., ZHANG, D. P. Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. In: *Mol. Genet. Genomics*. 2005, vol. 273, pp. 484–490. ISSN: 1617-4615.
376. SHANG, J., XI, D. H., YUAN, S. et al. Difference of physiological characters in dark green islands and yellow leaf tissue of Cucumber mosaic virus (CMV)-infected *Nicotiana tabacum* leaves. In: *Z. Naturforsch.* 2010, vol. 65, pp. 73–78. ISSN: 0340-4811.
377. SHARMA, N., SAHU, P. P., PURANIK, S., PRASAD, M. Recent advances in plant-virus interaction with emphasis on small interfering RNAs (siRNAs). In: *Mol. Biotechnol.* 2013, vol. 55, pp. 63–77. ISSN: 1073-6085.
378. SHARMA, C., CHANDEL, S., KAUR, R. *In vitro* callus multiplication and shoot regeneration of resistant calli of carnation cv. Raggia-de-Sole against *Rhizoctonia solani* Kuhn. In: *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 2009, vol. 3 (1), pp. 49-52. ISSN: 1749-0294.
379. SHEWRY, P. R., PRATT, H. M., FINCH, R. A., MIFLIN, B. J. The genetic analysis of hordein polypeptides from single seeds of barley. In: *Heredity*. 1978, vol. 40, pp. 463-466. ISSN: 0022-1503.
380. SHEWRY, P. R., PRATT, H. M., CHALTON, M. J., MIFLIN, B. J. Two-dimensional separation of the prolamins of normal and high lysine barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Journal of Experimental Botany*. 1977, vol. 104, pp. 597-606. ISSN: 0022-0957.

- 381.SHEWRY, P. R. Barley Seed Protein. In: *Barley: Chemistry and Technology*. Alexander W.M., Rattan, S.B. Minnesota (Eds). American Association of Cereal Chemists, 1993, pp. 131-197. ISBN: 1891127799.
- 382.SHIMAMURA, M., DEGUCHI, H., MINEYUKI, Y. Meiotic cytokinetic apparatus in the formation of the linear spore tetrads of *Conocephalum japonicum* (Bryophyta). In: *Planta*. 1998, vol. 206, pp. 604-610. ISSN: 0032-0935.
- 383.SHIVAPRASAD, P. V., CHEN, H.-M., PATEL, K. et al. A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site–leucine-rich repeats and other mRNAs. In: *The Plant Cell*. 2012, vol. 24, pp. 859–874. ISSN: 1532-298X.
- 384.SIJEN, T., FLEENOR, J., SIMMER, F. et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. In: *Cell*. 2001, vol. 107, pp. 465–476. ISSN: 0092-8674.
- 385.SILVA-BELTRÁN, N. P., RUIZ-CRUZ, S., CIRA-CHÁVEZ, L. A. 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. ISSN: 1687-8779.
- 386.SINGH, P., SRIVASTAVA, A.K., SINGH, A.K. Cell cycle stage specific application of cypermethrin and carbendazim to assess the genotoxicity in somatic cells of *Hordeum vulgare* L. In: *Bull Environ Contam Toxicol.*, 2008, vol. 81, pp. 258–261. ISSN: 1432-0800.
- 387.SLOOTWEG, E., ROOSIEN, J., SPIRIDON, L. N. et al. Nucleocytoplasmic distribution is required for activation of resistance by the potato NB-LRR receptor *Rx1* and is balanced by its functional domains. In: *The Plant Cell*. 2010, vol. 22, pp. 4195–4215. ISSN: 1532-298X.
- 388.SMEREA, S. Assessment of variation on potato somaclones using biochemical analysis. In: *Conservation of Plant Diversity*. International scientific symposium dedicated to the 65th anniversary of the Botanical Garden (Institute) of the Academy of Sciences of Moldova, 28-30 September, 2015, Chisinau, p. 103. ISBN 978-9975-3036-8-2.
- 389.SONIYA, E.V., BANERJEE, N.S., DAS, M.R. Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. In: *Current Sci*. 2001, vol. 80, pp.1231-1215. ISSN: 0011-3891.
- 390.SPENCER, J. P. E., KUHNLE, G. G. C, HAJIREZAEI, M. et al. The genotypic variation of the antioxidant potential of different tomato varieties. In: *Free Radical Research*, 2005, vol. 39, pp. 1005–1016. ISSN: 1071-5762.
- 391.SPOONER, D.M., PERALTA, I.E., KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. In: *Taxon*. 2005, vol. 54 (1), pp. 43–61. ISSN: 1996-8175.
- 392.SRIVASTAVA, H.K. Correlation between chiasma frequency and quantitative traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). In: *Theor. Appl.Genet*. 1980, vol. 56, pp. 113-117. ISSN: 0040-5752.
- 393.STARE, T., STARE, K., WECKWERTH, W. et al. Comparison between proteome and transcriptome response in potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves following Potato virus Y (PVY) infection. In: *Proteomes*. 2017, vol. 5 (14), pp. 1-12. ISSN: 2227-7382.
- 394.SUDHAKAR, R., NINGE GOWDA, K.N., VENU, G. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. In: *Cytologia*. 2001, vol. 66, pp. 235–239. ISSN: 0011-4545.
- 395.SUJA, J. A., ANTONIO, C., GARCIA de la VEGA, C., RUFAS, J. S. Supernumerary chromosome segments and intrabivalent chiasma redistribution in *Pyrgomorpha conica* (Orthoptera). In: *Heredity*. 1994, vol. 73, pp. 1-10. ISSN: 0022-1503.
- 396.SUNDERLAND, N., HUANG, B. Ultrastructural aspects of pollen dimorphism. In: *Int Rev Cytol*. 1987, vol. 107, pp. 175–220. ISSN: 0074-7696.

397. SWIECICKI, W., WOLKO, B., APISITWANICH, S., KRAJEWSKI, P. An analysis of isozymic loci polymorphism in the core collection of the Polish *Pisum* genebank. In: *Genet. Resour. and Crop Evol.* 2000, vol. 47, no. 6, pp. 583-589. ISSN: 0925-9864.
398. TAKEDA, S., PASZKOWSKI, J. DNA methylation and epigenetic inheritance during plant gametogenesis. In: *Chromosoma*. 2006, vol. 115, pp. 27-35. ISSN: 1432-0886.
399. TALARCZYK, A., KRZYMOWSKA, M., BORUCKI, W., HENNIG, J. Effect of yeast *CTA1* gene expression on response of tobacco plants to tobacco mosaic virus infection. In: *Plant Physiol.* 2002, vol. 129, pp. 1032-1044. ISSN: 1532-2548.
400. TENG, N., HUANG, Z., MU, X. Microsporogenesis and pollen development in *Leymus chinensis* with emphasis on dynamic changes in callose deposition. In: *Flora*. 2005, vol. 200, pp. 256-263. ISSN: 0367-2530.
401. TEMPELAAR, M. J., DE BOTH, M. T. J., VERSTEEGH, J. E. G. Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen staining procedure for *Vicia faba*. In: *Mutation Res.* 1982, vol. 103, pp. 321-326. ISSN: 0921-8777.
402. THIVIERGE, K., NICAISE, V., DUFRESNE, P. J. et al. Plant virus RNAs coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events. In: *Plant Physiology*. 2005, vol. 138, pp. 1822-1827. ISSN: 1532-2548.
403. TOH, H., HAYASHIDA, H., MIYATA, T. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. In: *Nature*. 1983, vol. 305, pp. 827-829. ISSN: 1476-4687(web).
404. TONGTONG G., FANG, Y. Functional organization and dynamics of the cell nucleus. In: *Plant Science*. 2014, vol. 5, pp. 1-12. ISSN: 0168-9452.
405. TORREZAN, R., POGLIARINI M. S. Influence of heterochromatin on chiasma localization and terminalization in maize. In: *Caryologia*. 1995, vol. 48, pp. 247-253. ISSN: 0008-7114.
406. TRUNIGER, V., ARANDA, M. A. Recessive resistance to plant viruses. In: *Adv. Virus Res.* 2009, vol. 75, pp. 119-159. ISSN: 0065-3527.
407. UCHIYAMA, S., DOI, T., FUKUI, K. Isolation of human and plant chromosomes as nanomaterials. In: *Chromosome and nanoscience and technology*. Edited by Fukui K., Ushiki T., CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008, pp. 155-166. ISBN: 978-1-4200-4491-1.
408. UCUR, A., PALANDUZ, S., CEFLE, K. et al. Sister chromatid exchange and mitotic index in patients with cirrhosis related to hepatitis B and C viruses and in chronic carriers. In: *Hepatogastroenterology*. 2003, vol. 50, nr. 54, pp. 2137-2140. ISSN 0172-6390.
409. UMA, B., RANI, T. S., PODILE, A. R. Warriors at the gate that never sleep: non-host resistance in plants. In: *J. Plant Physiol.* 2011, vol. 168, pp. 2141-2152. ISSN: 0176-1617.
410. van der HOORN, R. A. L., KAMOUN, S. From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. In: *Plant Cell*. 2008, vol. 20, pp. 2009-2017. ISSN: 1532-298X.
411. VANDENHOVE, H., VANHOUDT, N., CUYPERS, A. et al. Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernible effects on oxidative stress pathways. In: *Plant Physiol. Biochem.*, 2010, vol. 48, pp. 778-786. ISSN: 1532-2548.
412. VELAZHAHAN, R., DATTA, S. K., MUTHUKRIHNNAN, S. The PR-5 family: thaumatin-like proteins. In: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC Press. Edited Datta S.K., Muthukrihnan S., 1999. pp.107-129. ISBN: 0849306973.
413. VERLAAN, M. G., HUTTON, S. F., IBRAHEM, R. M. et al. The Tomato yellow leaf curl virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-Class RNA-

- dependent RNA polymerases. In: *PLoS Genet.* 2013, 9:e1003399. ISSN: 1553-7404 (web).
- 414.VESSELINA, N., MATEU-ANDRÉS, I. Microsporogenesis in three wild species of the genus *Antirrhinum* L. (*A. litigiosum* Pau, *A. pulverulentum* Lazaro and *A. subbaeticum* Güemes, Sánchez and Mateu). In: *Caryologia.* 2010, vol. 63, pp. 304–313. ISSN: 0008-7114.
 - 415.VILLENEUVE, A. M., HILLERS, K. J. Whence meiosis? In: *Cell.* 2001, vol. 106, pp. 647-650. ISSN: 1097-4172.
 - 416.VLOT, A. C., KLESSIG, D. F., PARK, S. W. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008, vol. 11, pp. 436–442. ISSN: 1369-5266.
 - 417.VOLOSICIUC, L. Manifestation of epizootic effects of entomopathogenic infections. In: *Microbial Biotechnology*, 4th Edition Int. Conf., Chisinau, October 11-12, 2018, pp.33-34. ISBN 978-9975-3178-8-7.
 - 418.WADA, M. Y., IMAI, H. T. Theoretical analysis of chiasmata using a novel chiasma graph method applied to Chinese hamster, mice, and dog. In: *Jpn. J. Genet.* 1995, vol. 70, pp. 233–265. ISSN: 0021-504X.
 - 419.WANG, D., MAULE, A. J. Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. In: *Science.* 1995, vol. 267, pp. 229-231. ISSN: 0968-0004.
 - 420.WANG, Y., MAGNARD, J.-L., MCCORMICK, S., YANG, M. Progression through meiosis I and meiosis II in *Arabidopsis* anthers is regulated by an A-type cyclin predominately expressed in prophase I. In: *Plant Physiol.* 2004, vol. 136, pp. 4127–4135. ISSN: 1532-2548.
 - 421.WESTERGAARD M., von WETTSTEIN D. The synaptonemal complex. In: *Annu. Rev. Genet.* 1972, vol. 6, pp.71–110. ISSN: 0066-4197.
 - 422.WIERMER, M., FEYS, B. J., PARKER, J. E. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005, vol. 8, pp. 383–389. ISSN: 1369-5266.
 - 423.WIJNKER, E., JONG, H. Managing meiotic recombination in plant breeding. In: *Trends in Plant Science.* 2008, vol. 13, pp. 640-646. ISSN: 1360-1385.
 - 424.WILSON, D. M., THOMPSON, L. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. In: *Mutation Research.* 2007, vol. 616, nr. 1-2, pp. 11-23. ISSN: 0921-8777.
 - 425.WOLFF, S., BODYCOTE, J., PAINTER, R. B. Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by U.V. irradiation at different stages of cell cycle: the necessity for cell to pass through S. In: *Mutation Research.* 1974, vol. 25, pp.73–81. ISSN: 0921-8777.
 - 426.WRIGHT, S. I., AGRAWAL, N., BUREAU, T. E. Effects of recombination rate and gene density on transposable element distributions in *Arabidopsis thaliana*. In: *Genome Res.* 2003, vol. 13, no. 8, pp. 1897-1903. ISSN: 1088-9051.
 - 427.WU, T. C., LICHTEN, M. Factors that affect the location and frequency of meiosis induced double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisia*. In: *Genetics.* 1995, vol. 140, pp. 55-66. ISSN: 0168-9525.
 - 428.XIA, S., CHENG, Y. T., HUANG, S. Regulation of transcription of nucleotide-binding leucine-rich repeat-encoding genes *SNC1* and *RPP4* via H3K4 trimethylation. In: *Plant Physiol.* 2013, vol. 162, pp. 1694–1705. ISSN: 1532-2548.
 - 429.XIA, Z., ZHAO, Z., CHEN, L. et al. Synergistic infection of two viruses MCMV and SCMV increases the accumulations of both MCMV and MCMV-derived siRNAs in maize. In: *Scientific Reports.* 2016, 6:20520. E-ISSN: 2045-2322.
 - 430.XING, W. Effects of dNTPs on the SCE frequency in plant root tip cells. In: *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis.* 1997, vol. 379 (2), pp.117-119. ISSN: 0027-5107.

- 431.YAMAJI, Y., MAEJIMA, K., KOMATSU, K. et al. Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. In: *The Plant Cell*. 2012, vol. 24, pp. 778–793. ISSN: 1532-298X.
- 432.YANG, J., KANG, X. Microsporogenesis and flower development in *Eucalyptus urophylla* × *E. tereticornis*. In: *Breed Sci*. 2015, vol. 65, pp. 138–144. ISSN: 1344-7610.
- 433.YAO, H, ZHOU, Q, LI, J. et al. Molecular characterization of meiotic recombination across the 140 kb multigenic a1-sh2 interval. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2002, vol. 99, pp. 6157-6162. ISSN: 1091-6490.
- 434.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. ISSN: 0147-6513.
- 435.YI, H., SI, L. Vicia root-micronucleus and sister chromatid exchange assays on the genotoxicity of selenium compounds. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007, vol.630, nr.1-2, pp.92-96. ISSN: 1383-5718.
- 436.YUAN, H., ZHANG, Z. Some factors affecting sister-chromatid differentiation (SCD) and sister-chromatid exchange (SCE) in *Hordeum vulgare*. In: *Mutat Res*. 1992, vol. 272 (2), pp.125-131. ISSN: 0027-5107.
- 437.YUKHIMENCO, A.I., VOLOSHCHUK, S.I., GIRCO, V.S. Winter wheat viruses as biological stress factors inducing genetic variation. In: *11th Congress of the FESPP*, Varna, 1998, p. 222. ISBN: 0981-9428.
- 438.ZACCOMER, B., HAENNI, A.-L., MACAYA, G. The remarkable variety of plant RNA virus genomes. In: *Journal of General Virology*. 1995, vol. 76, pp. 231-247. E-ISSN: 1465-2099.
- 439.ZAITLIN, M., HULL, R. Plant virus–host interactions. In: *Annual Review of Plant Physiology*. 1987, vol. 38, pp. 291–315. ISSN: 0066-4294.
- 440.ZAVALIEV, R., UEKI, S., EPEL, B.L., CITOVSKY, V. Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. In: *Protoplasma*. 2011, vol. 248, pp. 117–130. ISSN: 0033-183X.
- 441.ZHANG, Z., YANG, J. Effects of amino acids on sister-chromatid exchanges. In: *Mut. Res*. 1992, vol. 280, no. 4, pp. 279-283. ISSN: 0921-8777.
- 442.ZICKLER, D., KLECKNER, N. The leptotene-zygotene transition of meiosis. In: *Annual Review of Genetics*.1998, vol. 32, pp. 619-697. ISSN: 0066-4197.

surse în limba rusă

- 443.АВЕРЬЯНОВ, А.А. Активные формы кислорода и иммунитет растений. In: *Успехи современной биологии*. 1991, т. 111, стр. 722-737. ISSN: 0042-1324.
- 444.АВETISOBA, В. А., ВАЛЕВА, С. А. Индуцирование хлорофильных мутаций у ячменя при совместной обработке семян гамма-квантами и растворами этиленимина в различных концентрациях. In: *Генетика*. 1971, т. VII, nr. 2, с. 30-32. ISSN: 0016-6758.
- 445.АЛТУХОВ, Ю. П. *Генетические процессы в популяциях*. М. Академкнига, 3-е изд., 2003. 432 с. ISBN: 5-94628-083-X.
- 446.АНДРОНИК, Л. Экспрессия некоторых генов ячменя в потомстве вирус-инфицированных родительских форм. In: *Фундаментальные и прикладные исследования в биоорганическом сельском хозяйстве России, СНГ и ЕС*. Международная научно-практическая конференция, Москва, 9-12 августа 2016, сс. 92-101. ISBN 978-5-98467-015-9.
- 447.АНДРОНИК, Л. И. Генотипическая изменчивость в потомстве вирус инфицированных генотипов томата. В: *Культурные растения для устойчивого*

- сельского хозяйства в XXI веке (иммунитет, селекция, интродукция). Том IV, Часть I. Москва, 2011, с. 343-348. ISBN 978-5-902178-50-7.
448. **АНДРОНИК, Л.И.** Полиморфизм гордеинов в популяциях ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.), полученных от вирус-инфицированных родительских форм. In: *Плодоводство и ягодоводство России*. Том XXXIV, часть 1, 2012, с. 17-23. ISSN: 2073-4948.
449. **АНДРОНИК, Л. И., БАЛАШОВА, И. Т., БУЖОРЯНУ, В. В., СМЕРЯ, С. В.** Специфические реакции разных генотипов томата *Solanum lycopersicum* L. на заражение вирусами. In: *Плодоводство и ягодоводство России*, 2017, том XXXXVIII, часть I. с. 17-22. ISSN: 2073-4948.
450. **БАЕР, Г. Я., ЕМЕЦ, А. И., СТАДНИЧУК, Н. А., и др.** Соматическая вариативность как источник для создания новых сортов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. In: *Цитология и генетика*. 2007, т. 4, с. 9-14. ISSN 0564-3783.
451. **БЕЛКИНА, С. В.** Прогнозирование синергизма мутагенных, канцерогенных и летальных эффектов при взаимодействии различных факторов окружающей среды: дис. канд. биол. наук, Москва, 2007, 163 с.
452. **БУЖОРЯНУ, В.В., НАСТАС, Л.А., КИРИЯК, Г.Я.** Особенности морфогенеза и мейоза у мутантов томатов 393 и 504 пораженных нулевым штаммом вируса табачной мозаики. В сб.: *Рекомб. и его знач. в эв.* Кишинев, Штиинца, 1986, с. 194-196.
453. **БУРДУН, А. М., ПАНАРИН, И.В., ЗАБАВИНА, Е. С.** Способ получения рекомбинаций у пшеницы. Авторское свидетельство. СССР. 1982 г. 933052.
454. **БУТОРИНА, А.К., ДО НЬИ ТИЕН.** Ритмы суточной митотической активности у золотистой фасоли *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. In: *Цитология*. 2008, т. 50, нр. 8, с. 729-733. ISSN: 0564-3783.
455. **ГАВРЮШИНА, Е. С.** Кооперация между белками пикорнавирусов для преодоления защитных механизмов клетки. In: *Журнал общей биологии*. 2009, т. 70, нр. 3, с. 245-248. ISSN: 0044-4596.
456. **ГЕРАСКИН, С. А., ДИКАРЕВ, В. Г., ДИКАРЕВА, Н. С.** Влияние сочетанного радиоактивного и химического (тяжелые металлы, гербицид) загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя. In: *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2002. Т. 42, нр. 4, с. 369-383. ISSN: 0869-8031.
457. **ГРАСКОВА, И. А., РОМАНЕНКО, А. С., ВЛАДИМИРОВА, С. В., КОЛЕСНИЧЕНКО, А. В.** Изменение активности пероксидазы при патогенезе кольцевой гнили картофеля. In: *Физиология растений*. 2004, т. 51, нр. 4, с. 529-533. ISSN: 0015-3303.
458. **ГРАТИ, В. Г.** Цитологические основы формообразования и создания идентифицированного генофонда у томата: автореф. дис. докт. биол. наук, Кишинев, 1986, 48с.
459. **ГРИГОРОВ, Т.Б.** Изменчивость количественных признаков ячменя под влиянием вирусной инфекции отдельно или в сочетании с гамма излучениями в M₀-M₂ поколениях. In: *Плодоводство и ягодоводство России*. Москва, 2012, XXXIV(1), с. 170-177. ISSN: 2073-4948.
460. **ДМИТРИЕВА, С. А., МИНИБАЕВА, Ф. В., ГОРДОН, Л. Х.** Митотический индекс меристематических клеток и рост корней гороха *Pisum sativum* при действии модуляторов инозитольного цикла. In: *Цитология*. 2006, т. 48, нр. 6, с. 475-479. ISSN: 0564-3783.

- 461.ДОСПЕХОВ Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований), 5-е изд., Москва: Агропромиздат, 1985, 351 с. ISBN: 978-5-458-23540-2.
- 462.ЕРМАКОВ, А. И., АРАСИМОВИЧ, В. В., ЯРОШ, Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. Ленинград: Агропромиздат, 1987, 430 с.
- 463.ЖУЧЕНКО, А.А. *Экологическая генетика культурных растений и проблемы агроферы (теория и практика)*. М. ООО Изд-во «Агрорус», 2004, т. 1, 690 с. ISBN: 5-9900364-1-8.
- 464.ИВАНОВ, В.Б. Пролиферация клеток в растениях. In: *Итоги науки и техники. Сер. Цитология*. М: ВИНТИ, 1987, nr. 5, 216 с. ISSN: 0131-1751.
- 465.ИЛЬИНСКИХ, Н. Н., КСЕНЦ, А. С., ИЛЬИНСКИХ, Е. Н. и др. *Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность*. Томск, Изд-во Томского ун-та, 2011, 312 с.
- 466.КАЛЕНДАРЬ, Р. Н. *Исследование молекулярно-генетического полиморфизма генома ячменя (Hordeum vulgare L.) методом полимеразной цепной реакции*: дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук, Одесса, 1996, 105 с.
- 467.КАРТАШОВА, Е. Р., РУДЕНСКАЯ, Г. Н., ЮРИНА, Е. В. Полифункциональность растительных пероксидаз и их практическое использование. In: *С.-х. биология*. 2000, nr. 5, с. 63-70. ISSN 0131-6397.
- 468.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. ISSN: 0015-3303.
- 469.КОЗАК, М. Ф. Ритмы митоза у представителей рода *Glicine* L. In: *Цитология и генетика*. 2004, nr. 6, с. 7-12. ISSN: 0564-3783.
- 470.КОМАРОВА, Г., ДОРОХОВ, Д., РОТАРЬ, А. и др. Сравнительное исследование генома соматических линий кукурузы с использованием различных типов молекулярных маркеров. In: *Lucrări științifice. Agronomie*. Universitatea Agrară de Stat din Moldova, 2005, vol. 13, pp. 66-69. ISBN 978-9975-64-125-8.
- 471.КОСОВА, А. И., КИКУ, В. И. Цито-эмбриология томата. Кишинев, Штиинца, 1986, 232с. ISBN: 3803010301-147.
- 472.КУДРЯШОВА, О. В., ЖЛОБА, А. А. Закономерности образования сестринских хроматидных обменов (СХО) в трех генерациях после облучения. In: *Цитология*. 2000, т. 42, nr. 4, с. 392-398. ISSN: 0564-3783.
- 473.КУЗНЕЦОВА, О. И., АШ, О. А., ГОСТИМСКИЙ, С. А. Изучение продолжительности культивирования каллусов на накопление генетических изменений у регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.). In: *Генетика*, 2006, том. 42, nr. 5, с. 684-692. ISSN: 0016-6758.
- 474.ЛЕГКОБИТ, М. П., ХАДЕЕВА, Н. В. Изоферментные спектры кислых пероксидаз у представителей рода *Stachys*. In: *Генетика*. 2001, т. 37, nr. 7, с. 930-934. ISSN: 0016-6758.
- 475.ЛОГИНОВА, Д. Б., СИКОВА, О. Г. Механизмы образования нередуцированных гамет у цветковых растений. In: *Генетика*. 2017, т. 53, nr. 7, с. 769-784. ISSN: 0016-6758.
- 476.МАЛИНОВСКИЙ, В. И. *Механизмы устойчивости растений к вирусам*. Владивосток Дальнаука, 2010, 324 с. ISBN 978-5-8044-1167-7.
- 477.МАТИЕНКО, Б. Т., ЗАГОРНЯН, Е. М, РОТАРУ, Г.И. и др. *Принципы структурных преобразований у растений*. Кишинев. Штиинца. 1988. 238 с. ISBN: 5-376-00515-1.
- 478.НЕМЧИНОВ, Л. Г. *Генетическая изменчивость кукурузы в условиях вирусного патогенеза*: автореф. дис. к. б. н., Минск, 1990, 20 с.

- 479.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, пр. 3 (23), вып. 4, с. 133-140. ISSN 2075-4574.
- 480.ПАУШЕВА, З. П. *Практикум по цитологии растений*. Москва: Агропромиздат. 1988. 270 с. ISBN: 5-10-000614-5.
- 481.ПЕЛЕВИНА, И. И., ГОТЛИБ, В. Я., КУДРЯШОВА, О. В. и др. Свойства потомков облученных клеток. In: *Цитология* 1998, т. 40, пр. 5, с. 467-477. ISSN: 0564-3783.
- 482.ПИТИРИМОВА, М. А. Изменчивость ячменя при повторной обработке двух последовательных поколений мутагенными факторами. Сообщение I. Воздействие этиленимином на γ -облученные растения. In: *Генетика*. 1985, т. XXI, пр. 7, с. 1222-1224. ISSN: 0016-6758.
- 483.ПЛЕШКОВ, Б. П. *Практикум по биохимии растений*, М.: Агропромиздат, 1985, 255с.
- 484.ПОМОРЦЕВ, А. А. *Гордеин-кодирующие локусы как генетические маркеры в популяционных, филогенетических и прикладных исследованиях ячменя*: автореферат дисс. док. биол.наук, Москва, 2008, 48с.
- 485.ПОМОРЦЕВ, А. А., ЛЯЛИНА, Е. В. *Идентификация и оценка сортовой чистоты семян ячменя методом электрофоретического анализа запасных белков зерна*. М.: ТСХА, 2003, 83 с. ISBN 5-94327-180-5.
- 486.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, пр. 6, с. 815-828. ISSN: 0016-6758.
- 487.РОТАРЬ, А., КОМАРОВА, Г., МИКУ, В. Метод электрофореза белков – основа создания нового национального стандарта в Республике Молдова по определению степени гибридности семян кукурузы. In: *Genetica și ameliorarea plantelor, animalelor și microorganismelor*. Congr.VIII al asociației genet. și ameliorat. din Republica Moldova. Chișinău, 2005, p.189-193. ISBN: 9975-78-427-5.
- 488.ХАВКИН, Э.Е., ЗАБРОДИЛА, М.В. Наследуемые изменения в спектрах пероксидаз и эстераз у соматоклонов кукурузы. In: *Физиология растений*. 1994, т. 41, пр. 6, с. 859-867. ISSN: 0015-3303.
- 489.ШАГИМАРДАНОВА, Е. И., ГУСЕВ, О. А., СЫЧЕВ, В. Н. и др. Экспрессия генов стрессового ответа ячменя *Hordeum vulgare* в условиях космического полета. In: *Молекулярная биология*, 2010, т. 44 (5), с. 831-838. ISSN: 0026-8984.
- 490.ШАМИНА, Н.В. Диагностикум аномалий растительного мейоза по его продуктам. In: *Цитология*. 2006, том. 48, пр. 6, с. 486-494. ISSN: 0564-3783.

Anexa 1. Aspecte macrostructurale ale plantelor infectate cu virusuri

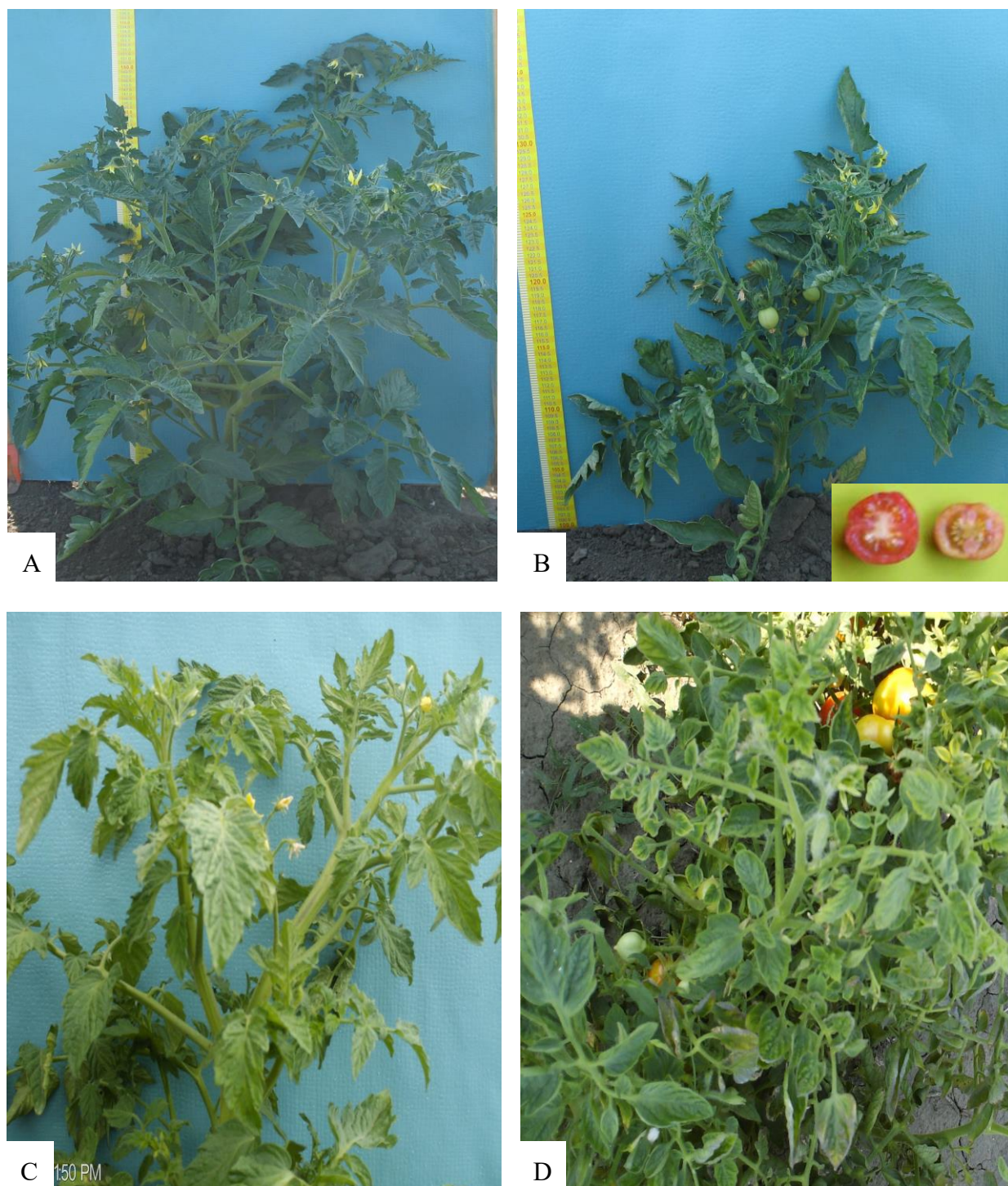


Fig. A.1.1. Simptome exterioare cauzate de infecții virale. Plante ale soiului Fachel sănătoase (A) și infectate cu VAT (B), VXC (C) și VMT (D).

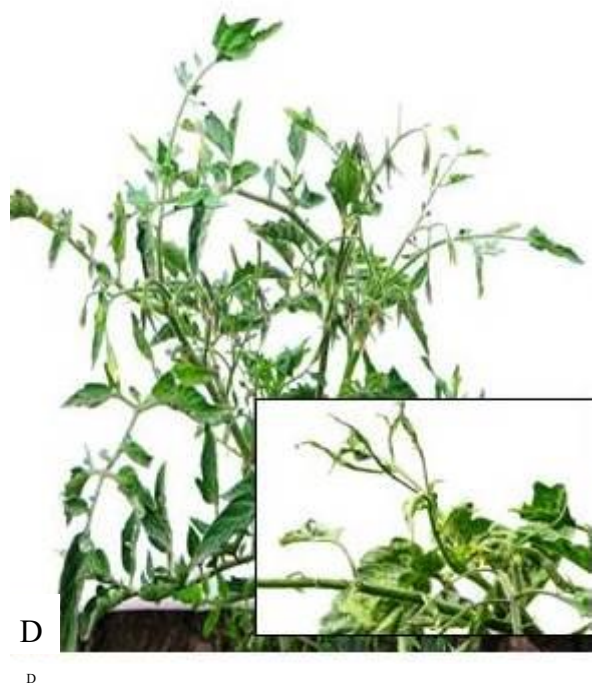


Fig. A.1.2. Aspectul exterior al plantelor de tomate infectate cu virusuri: plante ale s. Elvira, infectat cu VAT (A), VMT (B), VXC (C) și ale soiului Prizior infectat cu VAT (D).



A

D



B

D



C

D



D

D

Fig. A.1.3. Aspectul exterior al plantelor de orz. Plante sănătoase ale s. Sonor (A) și infectate cu VMDO (B), s. Galactic (C). Imagine macrostructurală a frunzelor de orz sănătoase (prima din stânga) și cu dungi clorotice longitudinale cauzate de VMDO (a II-a și a III-ea de la stânga).



A



B



C



D

Fig. A.1.4. Aspectul exterior al plantelor de varză infectate cu VMCo. Plante sănătoase ale s. Haricovscaia (A) și infectate (B), s. Amagher (C) și s. Podaroc (D).

Anexa 2. Particularitățile suprafeței grăuncioarelor de polen de orz examinate la microscopul cu forță atomică

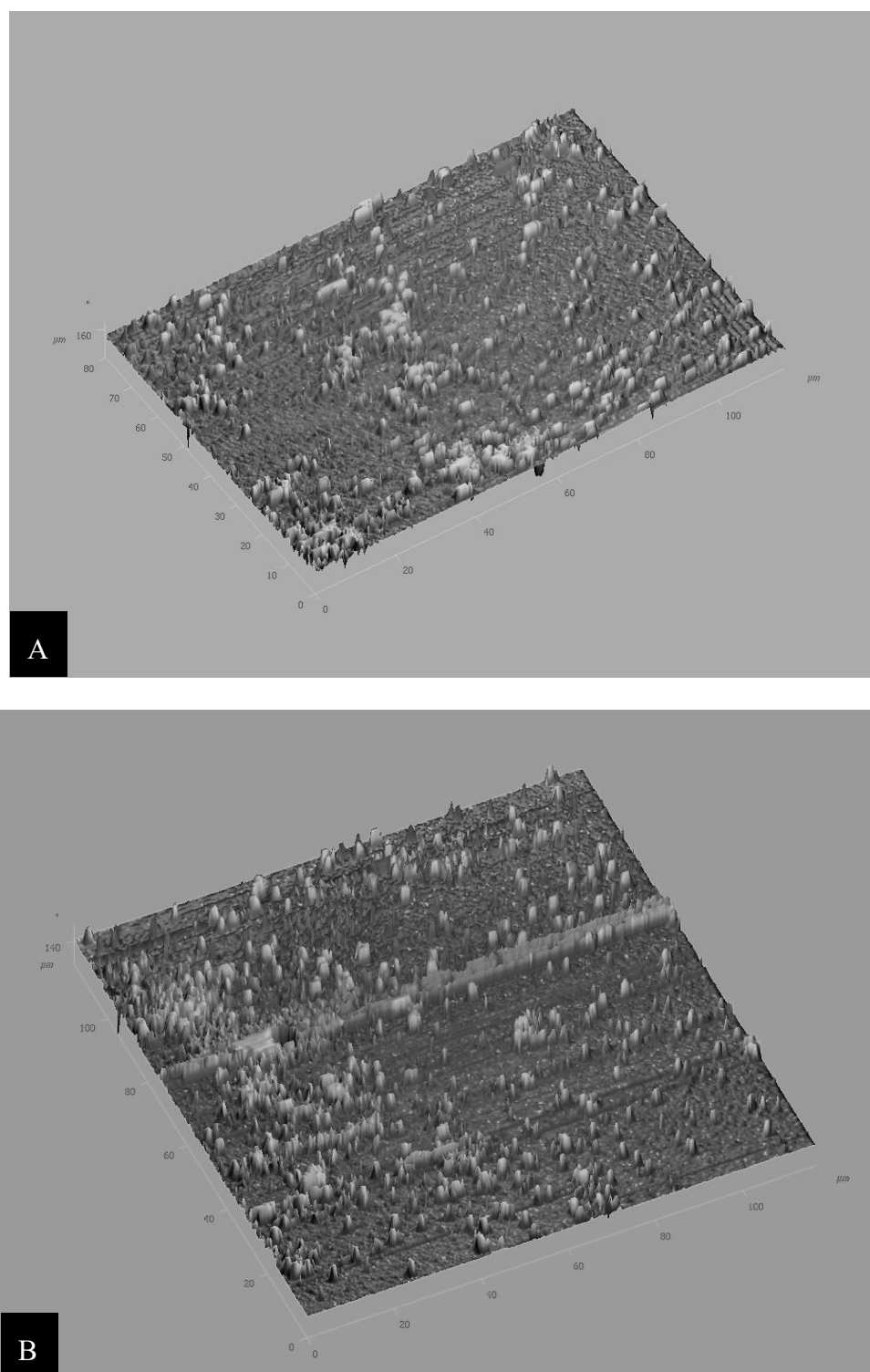


Fig. A.2.1. Aspectul suprafeței grăuncioarelor de polen a plantelor martor: s. Galactic (A), s. Unirea (B).

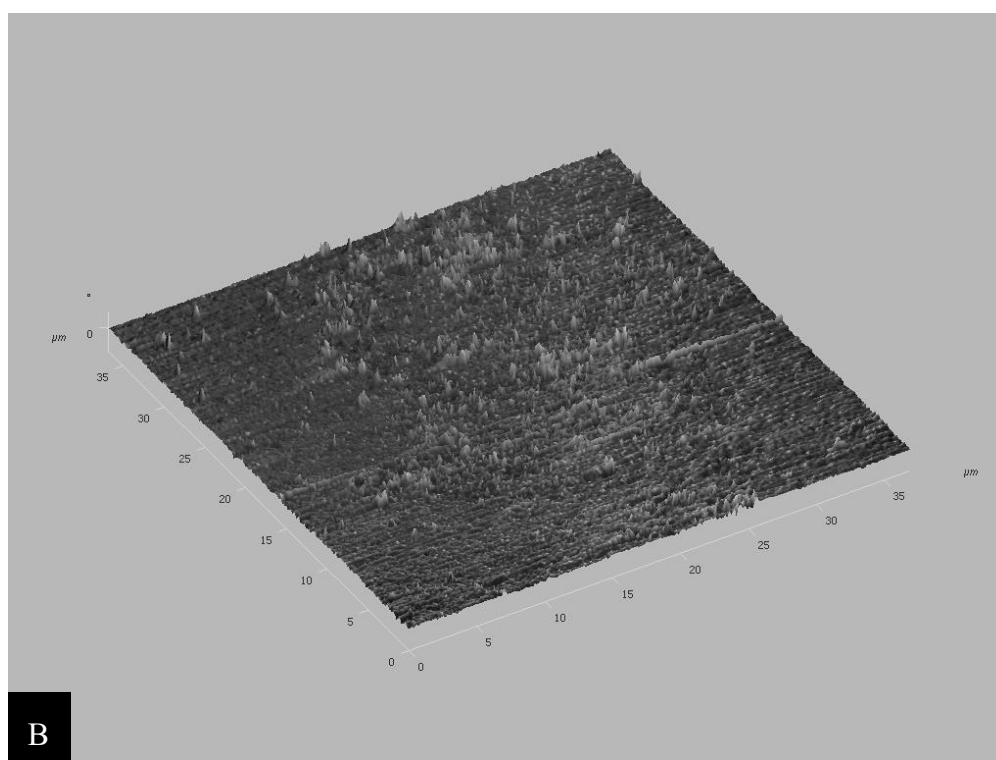
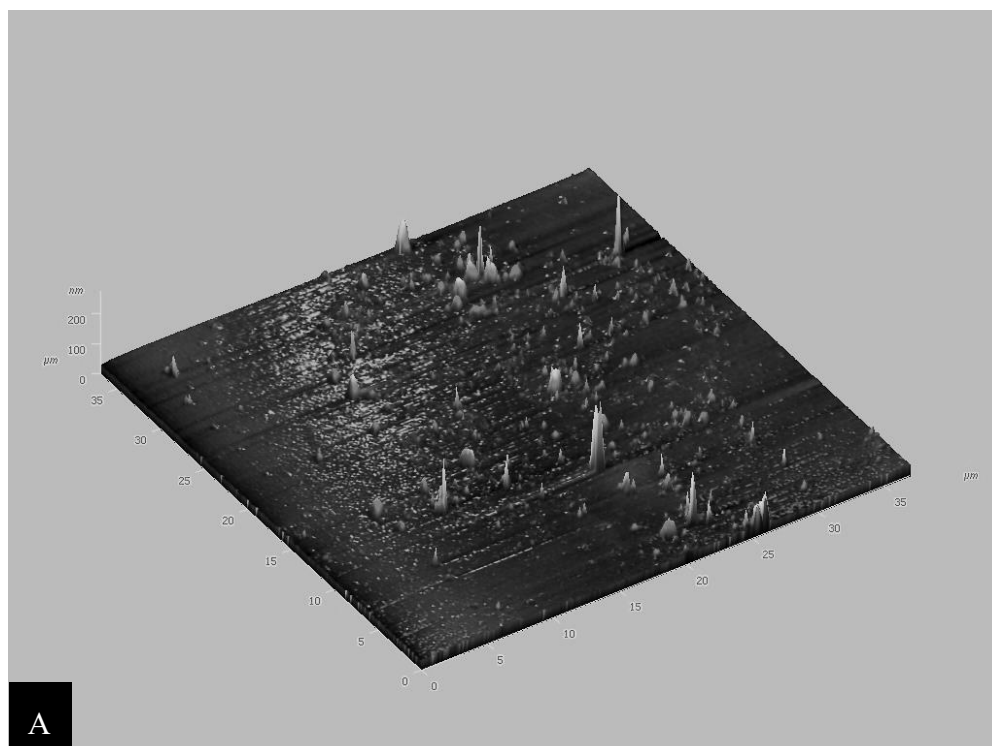


Fig. A.2.2. Aspectul suprafeței grăuncioarelor de polen a plantelor infectate cu VMDO: s. Galactic (A), s. Unirea (B).

Anexa 3. Tipuri de bivalenți conform distribuției chiasmelor la tomate în condiții de patogeneză virală

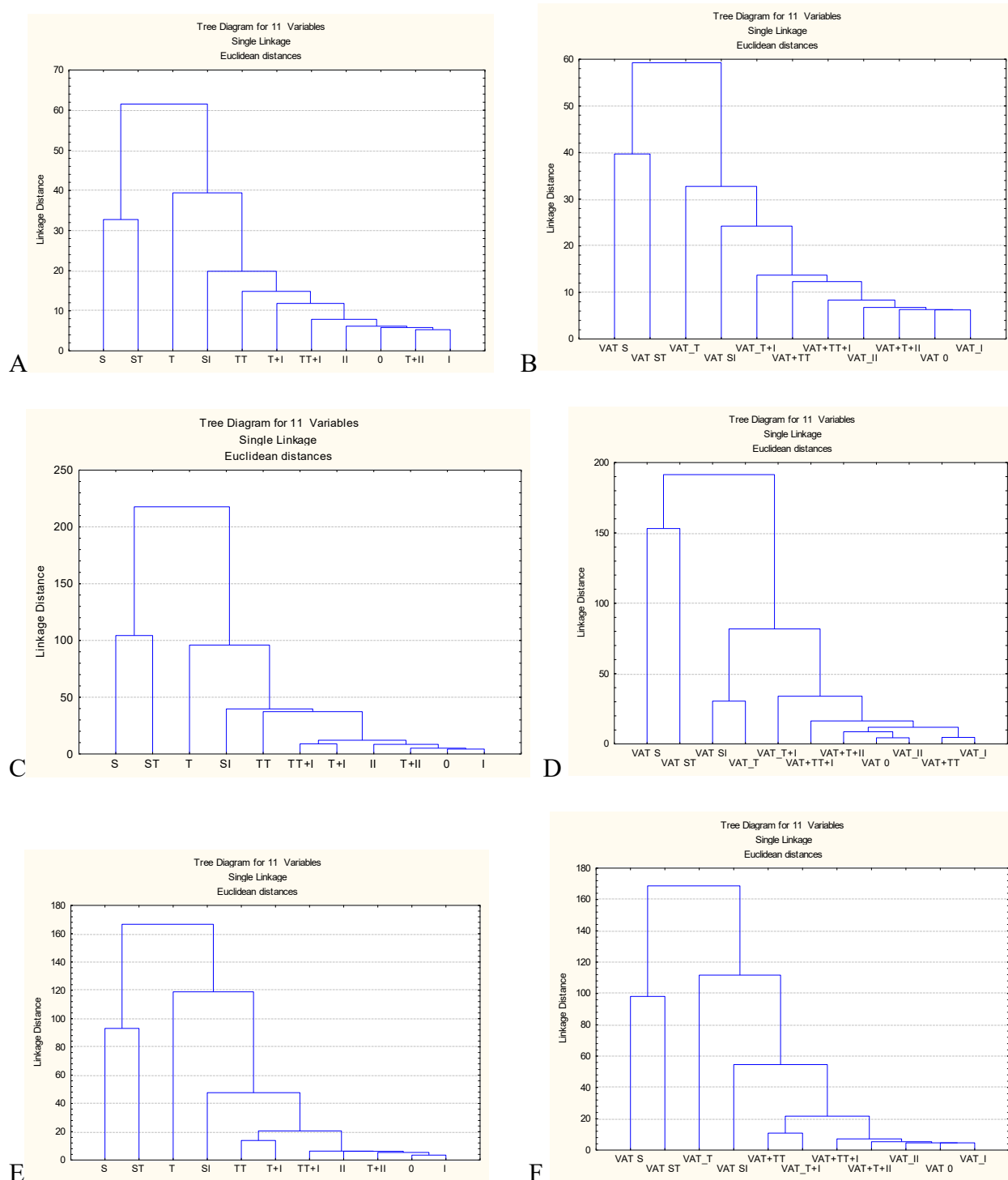


Fig. A.3.1. Dendrograma repartiției bivalenților conform distribuției chiasmelor în diachineză la tomatele sănătoase și infectate. Date sumare raportate la genotipurile analizate în varianta martor - A, infectate cu virusuri – B, la plantele soiului Nistru martor (C) și infectat (D), varietatea *S. racemigerum*, martor (E), infectată (F).

Anexa 4. Aspectul citologic al microsporilor de tomate la diferite etape ale procesului de meioză



Fig. A. 4.1. Metafaza I cu univalenți (x 450).



Fig. A. 4.2. Metafaza I cu eliminări de cromozomi (x 450).

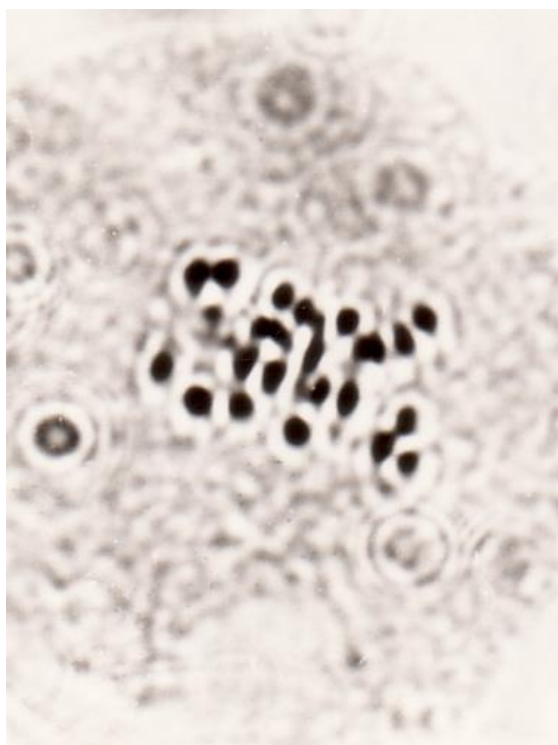


Fig. A. 4.3. Anafaza I tipurie cu cromozomi retardatari (x 450).

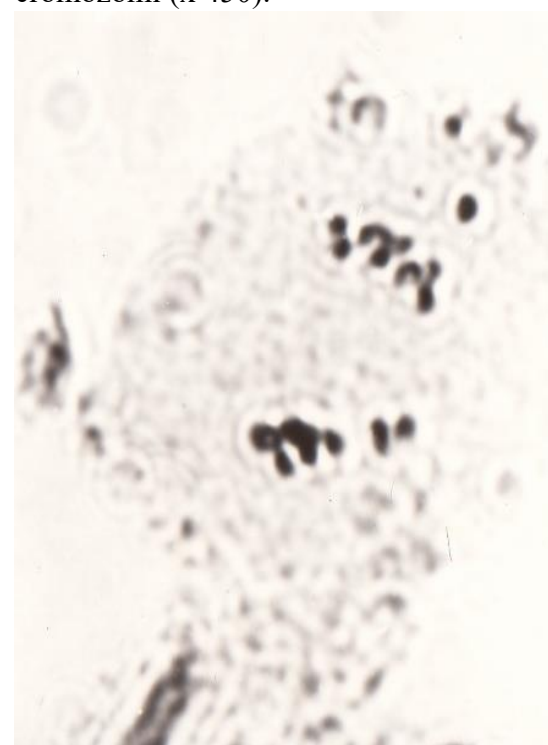


Fig. A. 4.4. Anafaza I cu eliminări d cromozomi (x 450).



Fig. A. 4.5. Anafaza I normală (x 450).



Fig. A. 4.6. Anafaza I cu o punte cromozomală (x 450).

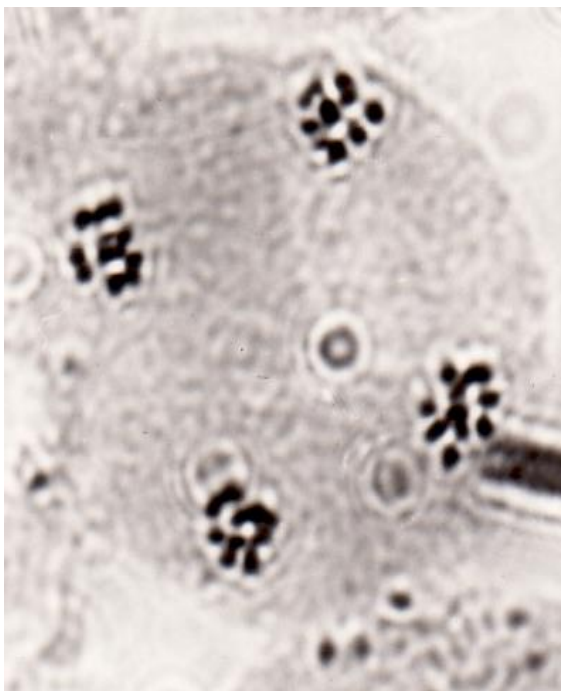


Fig. A. 4.7. Telofaza II normală (x 450).

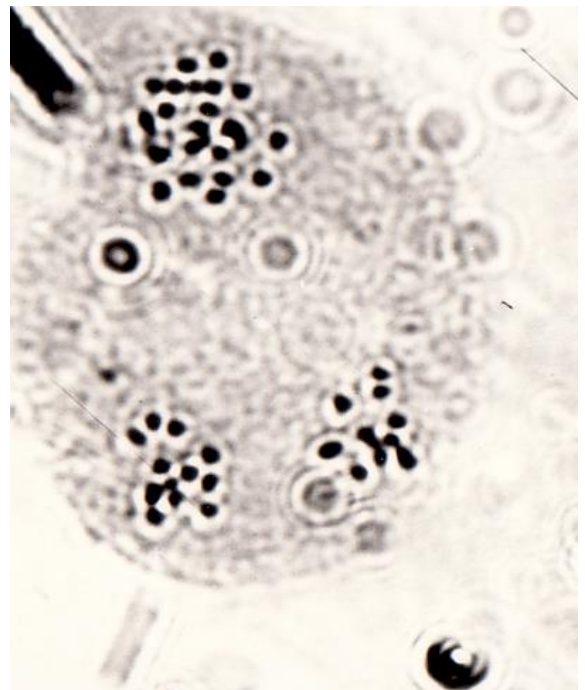


Fig. A. 4.8. Telofaza II cu nucleu nedivizat (x 450).

Anexa 5. Aspectul morfologic al sporadelor de tomate ale plantelor infectate cu virusuri

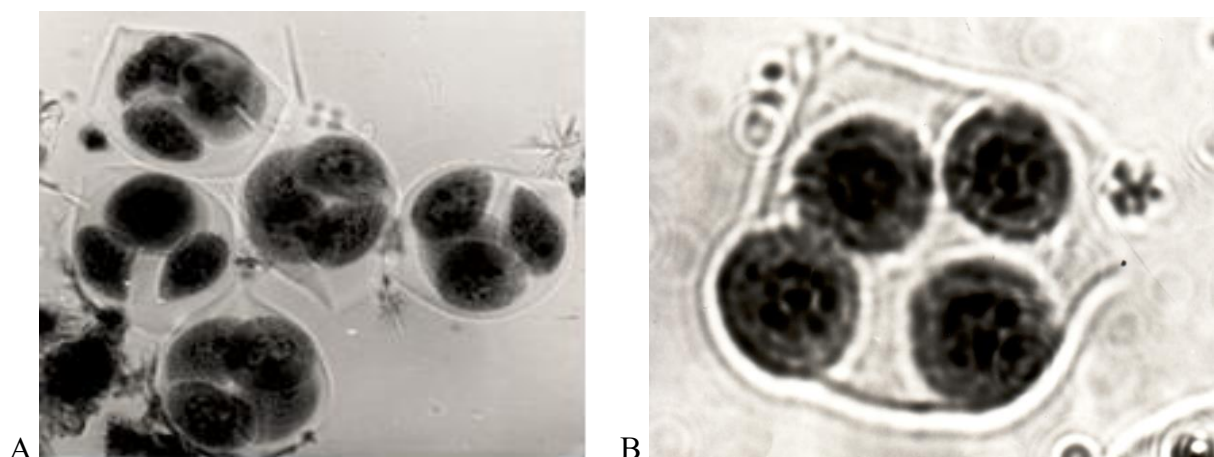


Fig. A. 5. 1. Tetrade normale în anterele s. Fachel: plante sănătoase (A) și infectate cu VAT (B) x 150.

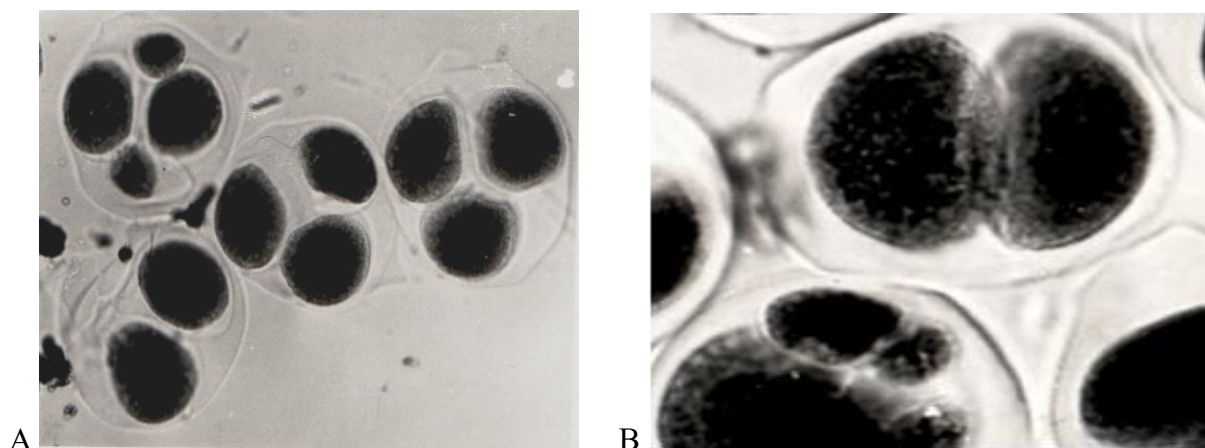


Fig. A. 5.2. Tetrade anormale în anterele s. Fachel: infectat cu VXC (A), diadă în varianta VAT (B) x 200.

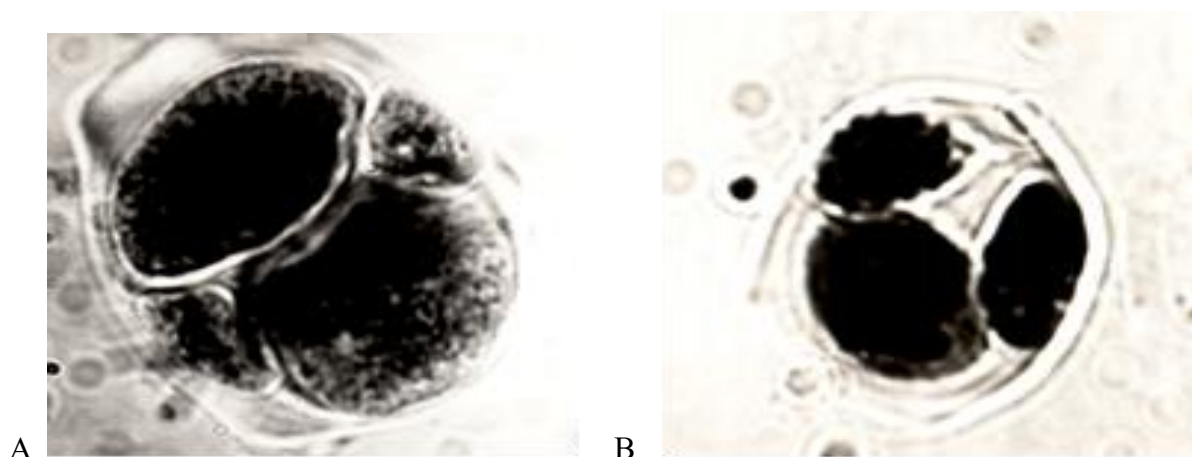


Fig. A. 5.3. Tetradă cu microspori anormali în varianta VAT: microspori neechivalenți (A), triadă cu microspori anormali (B) x 300.

Anexa 6. Variații morfologice la descendenții plantelor de tomate infectați cu virusuri

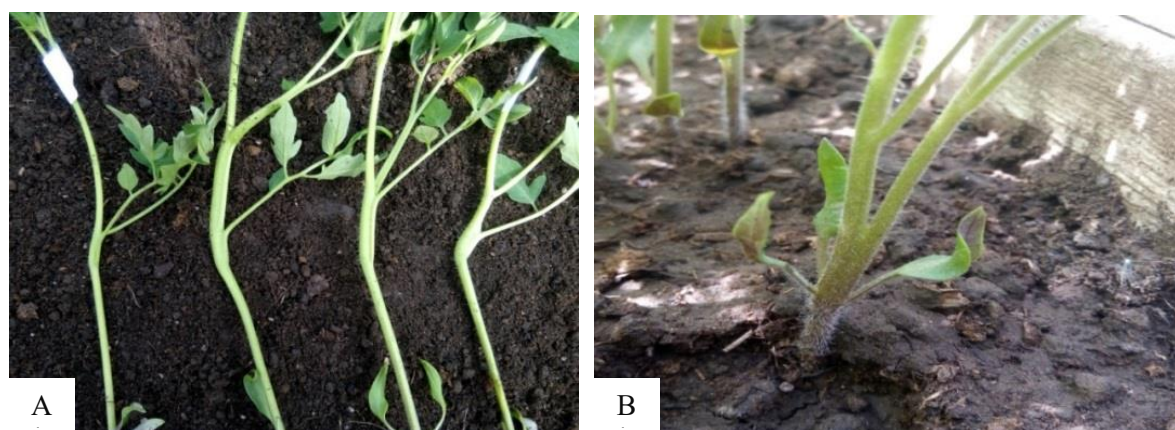


Fig. A. 6.1 Modificări ale tulpinii, tip *Regeneration I* la descendenții s. Elvira, variantele: WATT (A), VMT (B).

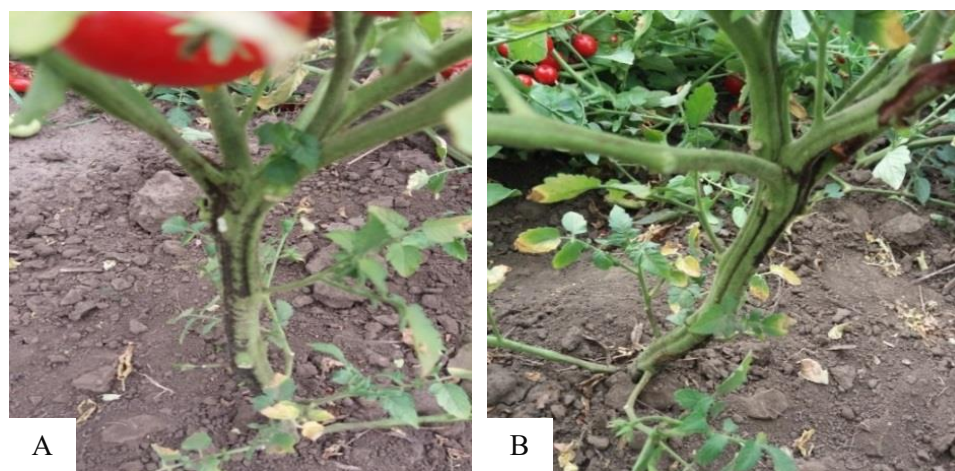


Fig. A. 6.2. Mutația tulpinii *Branching* la descendenții: s. Craigella (Tm-1/Tm-1) (A), varianta VAT, *S. pimpinellifolium*, varianta VAT (B).



Fig. A. 6.3. Variații morfologice ale habitusului plantei *Bushy* (A) și inflorescenței *Fab 2* (B) la descendenții s. Craigella (Tm-1/Tm-1), varianta VAT.



Fig. A 6.4. Mutațiile *Locule number* și *Fasciated* ale fructelor la descendenții *S. pimpinellifolium*, varianta VAT, la diferite faze de creștere și dezvoltare: formarea fructelor (A), coacerea fructelor (B).

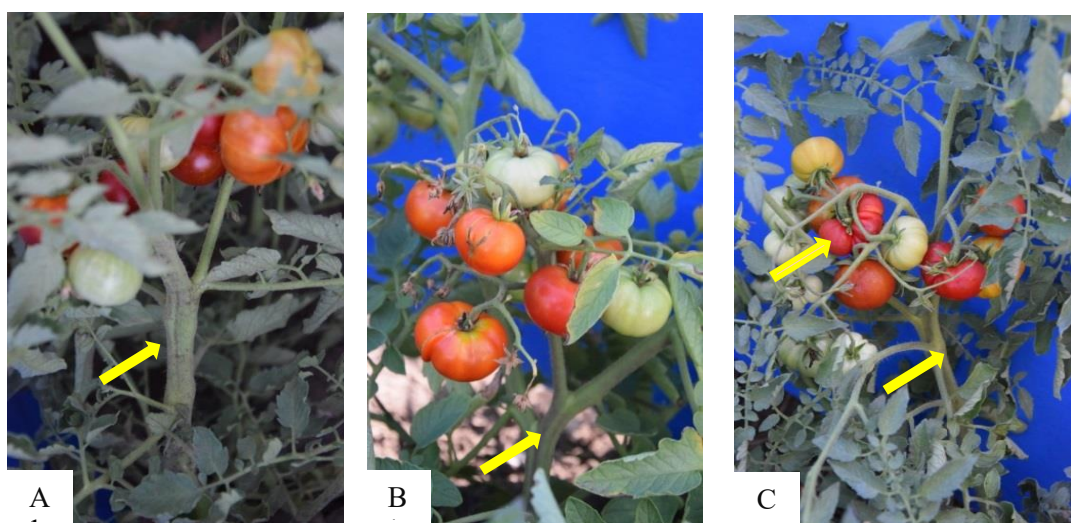


Fig. A. 6.5. Modificări morfologice multiple la descendenții generației II la genotipurile: s. Elvira, varianta VMT (A), *S. pimpinellifolium*, varianta VAT (B, C).

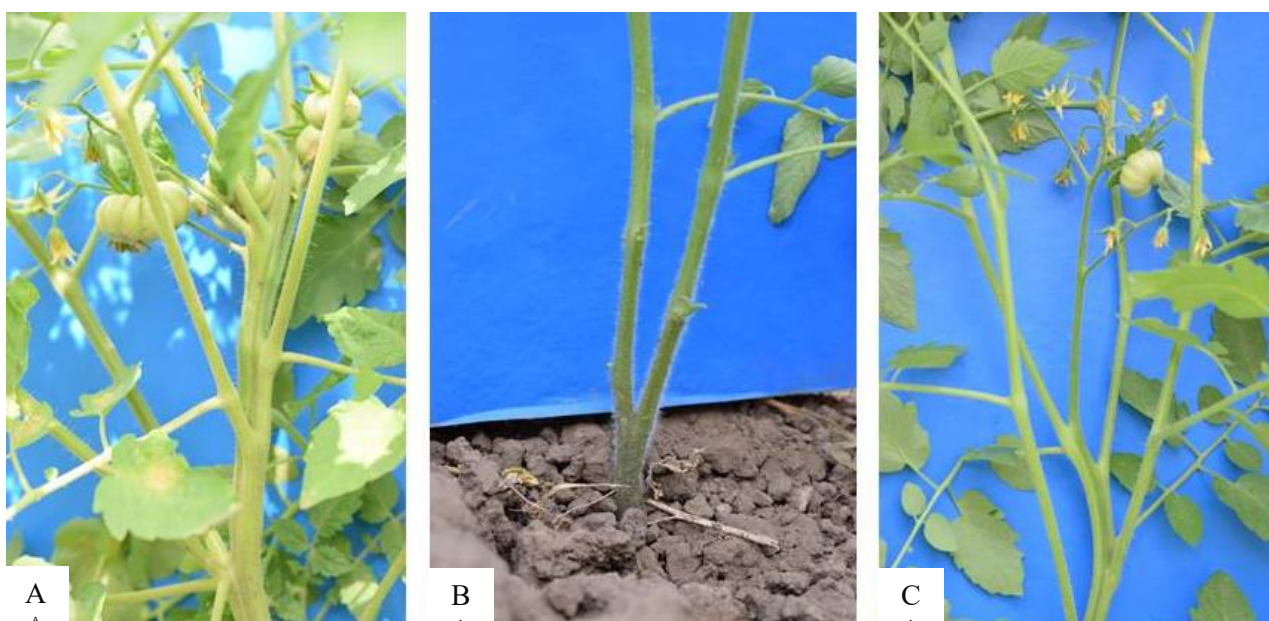


Fig. A. 6.6. Modificări morfologice multiple la descendenții generației III la genotipurile: s. Elvira (A), varianta VMT, *S. pimpinellifolium*, varianta VAT (B,C).



REPUBLICA MOLDOVA

AGEPI

AGENȚIA DE STAT
PENTRU
PROPRIETATEA
INTELECTUALĂ

BREVET

**DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

Nr. **200**

**ÎN TEMEIUL LEGII PRIVIND PROTECTIA INVENTIILOR, AGENȚIA DE STAT PENTRU
PROPRIETATEA INTELECTUALĂ ELIBEREAZĂ PREZENTUL BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

Procedeu de obținere a recombinanților de tomate

Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE
A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A
MOLDOVEI, MD

Data depozit: 2009.10.21

**DESCRIEREA INVENȚIEI, REVENDICĂRILE ȘI DESENELE CONSTITUIE PARTE
INTEGRANTĂ A PREZENTULUI BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ**

CONFIRM PRIN SEMNARE ȘI APLICAREA SIGILIULUI

DIRECTOR GENERAL

L. Holbec

CHIȘINĂU



MD 200 Z 2010.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 200 (13) Z

(51) Int. Cl.: A01H 1/04 (2006.01)

A01H 1/06 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12R 1/94 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2009 0198

(22) Data depozit: 2009.10.21

(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:

2010.05.31, BOPI nr. 5/2010

(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE
ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(72) Inventatori: ANDRONIC Larisa, MD; JACOTĂ Anatolie, MD; BUJOREANU Valeriu, MD

(73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE
ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD(54) **Procedeu de obținere a recombinanților de tomate**(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologia agricolă, și
anume la un procedeu de obținere a recombinanților
de tomate.

Procedeu de obținere a recombinanților de
tomate include prelucrarea termică a semințelor
mature la 70°C timp de 72 ore, iradierea acestora cu
raze gamma în doză de 150 Gy, germinarea
semințelor peste două săptămâni după iradiere,
sădirea semințelor germinate, infectarea plantelor în
faza de 4...6 frunze cu virusul aspermiei tomatelor,

2
5 colectarea fructelor formate pe al doilea ciorchine
din mugurii floriali ce au atins lungimea de 2...3
mm la a 15-a zi după infectare, separarea semin-
țelor și obținerea din ele a recombinanților de
tomate.

10 Rezultatul invenției constă în sporirea numă-
rului de recombinanți de tomate cu un spectru larg
de caractere cantitative.

Revendicări: 1

15

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologia agricolă, și anume la un procedeu de obținere a recombinanților de tomate.

5 Este cunoscut procedeu de obținere a recombinanților de tomate prin infectarea hibrizilor F_1 cu virusul mozaicului tutunului în faza de butonizare a primului ciorchine; colectarea fructelor legate din mugurii floriali aflați în fazele meiozei după 4...6 zile de la apariția primelor simptome de viroză; extragerea semințelor din aceste fructe și cultivarea din ele a plantelor cu selectarea formelor recombinante [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în aceea că el este îndelungat și complicat în realizare.

10 Problema pe care o rezolvă invenția constă în extinderea variabilității genetice la soiuri bazată pe utilizarea în calitate de factor recombinogen a virusului aspermiei tomatelor și a razelor gama.

Esența invenției constă în aceea că procedeu de obținere a recombinanților de tomate include prelucrarea termică a semințelor mature la 70°C timp de 72 ore, iradierea acestora cu raze gamma în doză de 150 Gy, germinarea semințelor peste două săptămâni după iradiere, sădirea semințelor 15 germinate, infectarea plantelor în faza de 4...6 frunze cu virusul aspermiei tomatelor, colectarea fructelor formate pe al doilea ciorchine din mugurii floriali ce au atins lungimea de 2...3 mm la a 15-a zi după infectare, separarea semințelor și obținerea din ele a recombinanților de tomate.

20 Rezultatul invenției constă în majorarea frecvenței și a spectrului recombinării meiotice la tomate; modificarea variației și diversificarea spectrului de forme noi ce îmbină caractere cantitative agronomice valoroase; simplificarea procedurii clasice de inducere a formelor noi cu caractere cantitative valoroase necesare procesului de ameliorare a soiurilor de plante.

Au fost cercetate soiurile de tomate Nistru, Prizior și Fachel. Semințele mature au fost prelucrate termic (la 70°C timp de 72 ore) în scopul inactivării germenilor patogeni. După cel puțin două zile de la tratamentul termic jumătate din semințe au fost iradiate cu raze gamma în doză de 150 Gy, utilizând 25 instalația RXM-y-20 (cu capacitatea de 0,65 Gy/s), unde în calitate de sursă radioactivă a servit elementul Co60. După două săptămâni de repaus toate semințele erau plasate în cutii Petri pe discuri din hârtie de filtru îmbibate cu apă distilată, apoi sădite în vase vegetative pentru obținerea răsadului. Jumătate din plantulele crescute din semințele iradiate, precum și jumătate din cele neiradiate, în faza de 4...6 frunze, au fost infectate mecanic cu extract al virusului aspermiei tomatelor. Plantulele crescute din 30 semințe neiradiate și neinfectate cu virusul aspermiei tomatelor au servit în calitate de martor. Astfel, toate plantulele fiecărui soi au fost divizate în patru variante experimentale: martor, radiație (plantule obținute din semințe iradiate), virus (plantule infectate cu virusul aspermiei tomatelor) și radiație + virus (plantule crescute din semințe iradiate și infectate cu virusul aspermiei tomatelor). Ulterior, toate plantele au fost răsădite în câmp în condiții similare conform standardelor agrotehnice. Fiecare lot a 35 inclus 30 plante aflate în aceeași fază ontogenetică. Identificarea plantelor infectate a fost realizată la 12...14 zile după infectare prin procedeu imunoenzimatic. Pentru studii ulterioare au fost utilizați mugurii floriali ai celui de-al doilea ciorchine ce au atins lungimea de 2...3 mm la a 15-a zi după infectare, ceea ce corespunde primului maxim al concentrației virionilor în țesuturile nefertile ale anterei. O parte din muguri au fost excizați și fixați pentru cercetări citologice, iar alți etichetați pentru 40 obținerea fructelor și semințelor.

Pentru studiul recombinării meiotice au fost obținute preparate citologice prin tehnica de colorare cu acetocarmină. În cadrul fiecărui lot experimental au fost evaluate cca 60 celule-mamă polinice aflate la etapa de diachineză timpurie. Drept indici ai recombinării meiotice au fost utilizate frecvența și 45 spectrul chiasmelor (tabelul 1).

Tabelul 1

Frecvența chiasmelor la soiurile de tomate în condiții de patogeneză

Soiul analizat	Tip chiasme	Martor	Virus	Radiație+virus
Nistru	interstițiale	3,243±1,065	5,216±0,854	5,405±0,927
	totale	16,973±1,771	17,865±1,988	18,432±2,062
Prizior	interstițiale	3,897±1,714	6,308±1,779	6,410±1,681
	totale	16,949±2,492	18,205±2,041	18,615±1,927
Fachel	interstițiale	3,308±0,893	6,256±1,229	6,538±1,143
	totale	15,972±1,559	19,538±1,699	20,154±2,097

virus – varianta experimentală ce include plantule infectate cu virusul aspermiei tomatelor;

50 radiație + virus – varianta experimentală ce include plante crescute din semințe iradiate și infectate cu virusul aspermiei tomatelor.

Conform datelor prezentate în tab.1, infectarea cu virusul aspermiei tomatelor a plantelor obținute din semințe iradiate a indus cea mai majoră creștere a frecvenței chiasmelor interstițiale, cărora le revine rolul principal în generarea variabilității genetice. Complimentarea efectului radiației cu cel cauzat de infecția virală a contribuit la sporirea frecvenței chiasmelor interstițiale față de cea mai 55 apropiată soluție de cca 1,5 ori la soiurile Nistru și Prizior și de 1,7 ori la soiul Fachel.

5 Fructele legate din florile rămase pe ciorchinele al doilea au fost etichetate și folosite pentru obținerea semințelor din care ulterior au fost crescute plante. La descendenți a fost studiat un șir de caractere morfologice: numărul de lăstari formați, numărul de inflorescențe de pe un lăstar și total per plantă, numărul de fructe legate pe un ciorchine și total per plantă, numărul de fructe legate pe un ciorchine și total per plantă, numărul de semințe per fruct și per plantă, masa unui fruct și masa totală a fructelor unui ciorchine și a plantei. În calitate de parametri fiziologici au fost estimați: începutul înfloririi și coacerii; înflorirea și coacerea în masă. Drept indici biochimici au fost analizați: conținutul substanțelor uscate și aciditatea.

10 Conform rezultatelor obținute la soiurile analizate a fost estimată o extensie accentuată a distribuției valorilor multor caractere cantitative, precum ar fi numărul total de fructe la o plantă, masa unui fruct al ciorchinelui al doilea, numărul de semințe ale unui fruct, numărul de ciorchini cu fructe (tab. 2).

Tabelul 2

15 Coeficientul de variație a unor caractere cantitative în cadrul soiurilor de tomate

Nr.	Parametrul cantitativ analizat	Genotipul analizat		
		Nistru	Prizior	Fachel
1	Fructe per plantă (nr.)	22,79...23,63	47,23...32,15	19,79...34,18
2	Fructe pe ciorchinele al doilea (nr.)	28,21...30,37	30,46...35,00	19,69...52,50
3	Masa unui fruct (g)	8,08...9,80	3,14...11,97	3,09...3,96
4	Masa unui fruct de pe ciorchinele al doilea (g)	10,53...19,79	12,66...17,06	5,77...16,20
5	Semințe per fruct (nr.)	4,36...10,55	3,12...11,60	3,66...18,25
6	Semințe per fruct de pe ciorchinele al doilea (nr.)	11,10...16,26	9,60...11,52	8,20...6,67
7	Lăstari laterali (nr.)	20,28...19,81	19,23...25,74	18,12...25,24
8	Ciorchini cu fructe (nr.)	15,88...31,80	15,17...31,95	14,89...32,39
9	Conținutul substanțelor uscate	0,90...0,88	1,53...0,89	1,30...1,94
10	Aciditatea	0,90...1,05	0,72...0,97	1,73...1,27

20 Datele prezentate în tab. 2 denotă că diapazonul modificării coeficientului de variație a fost în dependență de soiul analizat. Pentru unele caractere coeficientul de variație a fost modificat doar la un anumit soi. Așa de exemplu, numărul de fructe de pe ciorchinele al doilea la plantele martor, precum și la cele iradiate și infectate la soiul Nistru a variat aproximativ în aceeași proporție de 28,21 și 30,37%, în timp ce la soiul Fachel virusul aspermiei tomatelor în comun cu razele gamma au indus o majorare a variabilității acestui caracter de cca 2,7 ori.

25 Evaluarea coeficientului de variație a permis de a studia comparativ particularitățile individuale în cadrul aceluiași genotip. Utilizarea procedurii propus creează posibilitatea de a evidenția diversificarea formelor de tomate. Astfel, aplicarea radiației și a infecției virale a permis de a modifica interdependența dintre unele caractere corelate, așa cum ar fi masa fructului, numărul de semințe. În așa mod au fost obținute forme ale soiului Fachel cu masă mare a fructului și un număr redus de semințe; masă mare a fructelor primilor ciorchini (în particular al doilea) și conținut sporit de substanțe uscate.

(57) Revendicări:

5 Procedeu de obținere a recombinanților de tomate, care include prelucrarea termică a semințelor
 10 mature la 70°C timp de 72 ore, iradierea acestora cu raze gamma în doză de 150 Gy, germinarea
 semințelor peste două săptămâni după iradiere, sădirea semințelor germinate, infectarea plantelor în
 faza de 4...6 frunze cu virusul aspermiei tomatelor, colectarea fructelor formate pe al doilea ciorchine
 din mugurii floriali ce au atins lungimea de 2...3 mm la a 15-a zi după infectare, separarea semințelor
 și obținerea din ele a recombinanților de tomate.

(56) Referințe bibliografice:

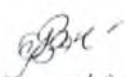
1. SU 1741677 A1 1992.06.23

Șef Secție:



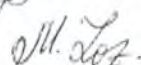
COLESNIC Inesa

Examinator:



BANTAȘ Valentina

Redactor:



LOZOVANU Maria

(2)
(2)
(3)
(5)
Tit
(7)
AC
I. C
II.
III.
Ind
IV.
Cat
A, I
A
A
A
A - c
gene
X - c
reve
impl
Y - c
reve
impl
docu
mult
E - d
depo
data
Data
Exan



REPUBLICA MOLDOVA

AGPI

AGENȚIA DE STAT
PENTRU
PROPRIETATEA
INTELECTUALĂ

BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. **251**

**ÎN TEMEIUL LEGII PRIVIND PROTECȚIA INVENȚIILOR, AGENȚIA DE STAT PENTRU
PROPRIETATEA INTELECTUALĂ ELIBEREAZĂ PREZENTUL BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

Procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară

Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE
A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A
MOLDOVEI, MD

Data depozit: 2010.04.22

**DESCRIEREA INVENȚIEI, REVENDICĂRILE ȘI DESENELE CONSTITUIE PARTE
INTEGRANTĂ A PREZENTULUI BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ**

CONFIRM PRIN SEMNARE ȘI APLICAREA SIGILIULUI

DIRECTOR GENERAL

CHIȘINĂU



MD 251 Z 2010.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **251** ⁽¹³⁾ **Z**

(51) Int. Cl.: *A01H 1/04* (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12R 1/94 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2010 0075
(22) Data depozit: 2010.04.22

(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:
2010.08.31, BOPI nr. 8/2010

(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE
ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(72) Inventatori: ANDRONIC Larisa, MD; GRIGOROV Tatiana, MD; BUJOREANU Valeriu, MD

(73) Titulari: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE
ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(54) **Procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la biotehnologia agricolă,
și mai precis la un procedeu de obținere a
recombinanților de orz de primăvară.

Procedeeul include iradierea semințelor cu
rază gamma în doză de 150 Gy, semănarea lor
peste 2 zile, infectarea plantelor în faza de
2-3 frunze cu virusul mozaicului dungat al
orzului în două repetări la interval de două zile,

5 colectarea semințelor formate în spice, semă-
narea semințelor colectate și obținerea din ele a
recombinanților de orz de primăvară.

Rezultatul invenției constă în sporirea
numărului de recombinanți de orz de primă-
vară cu un spectru larg de caractere cantitative.

10 Revendicări: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologia agricolă, și anume la un procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară.

Una din cele mai aplicabile metode de inducere a formelor noi în cadrul soiurilor este mutageneza experimentală.

Este cunoscut un procedeu netradițional de obținere a recombinanților în cadrul soiurilor de grâu bazat pe acțiunea virusului mozaicului dungat al orzului [1]. Conform procedurii dat plantulele de grâu în faza de 2...3 frunze se infectează cu virusul mozaicului dungat al orzului. Materialul semincer de grâu de la plantele infectate cu virus se colectează și ulterior se utilizează pentru obținerea recombinanților. Dezavantajul procedurii de referință rezidă în faptul că formele noi cu caractere netradiționale soiului inițial pot fi selectate începând cu generația a doua obținută de la părinți infectați.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea recombinanților de orz de primăvară prin majorarea variabilității genotipice și diversificarea caracterelor cantitative.

Procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară, conform invenției, include iradierea semințelor cu raze gamma în doză de 150 Gy, semănarea lor peste 2 zile, infectarea plantelor în faza de 2...3 frunze cu virusul mozaicului dungat al orzului în două repetări la interval de două zile, colectarea semințelor formate în spice, semănarea semințelor colectate și obținerea din ele a recombinanților de orz de primăvară.

Noutatea invenției constă în utilizarea asociată a virusului mozaicului dungat al orzului și a razelor gamma în scopul obținerii recombinanților de orz de primăvară cu un spectru diversificat de caractere cantitative în prima generație provenită de la plantele virus, ceea ce permite simplificarea procedurii clasice de inducere a formelor noi cu caractere cantitative valoroase în ameliorarea plantelor.

Rezultatul invenției constă în sporirea numărului de recombinanți de orz de primăvară cu un spectru larg de caractere cantitative.

Exemplu de realizare a invenției

În cercetare au fost antrenate soiurile de orz de primăvară Galactic, Sonor și Unirea. Jumătate din totalul de semințe incluse în experimente (nu mai puțin de 500 semințe pentru fiecare soi) au fost iradiate cu raze gamma în doză de 150 Gy, utilizând instalația RXM-γ-20 cu capacitatea de 0.20 Gy/s, unde în calitate de sursă radioactivă a servit elementul Co⁶⁰. După două zile de repaus toate semințele au fost semănate în câmp. Jumătate din plantulele crescute din semințele iradiate, precum și jumătate din cele neiradiate, în faza de 2...3 frunze, au fost infectate mecanic, în două repetări la interval de două zile, cu inocul al virusului mozaicului dungat al orzului. Drept inocul a servit extractul obținut în urma macerării frunzelor plantelor de orz, stabilite ca purtătoare de germeni ai virusului mozaicului dungat al orzului, diluat cu apă distilată în raport de 1:2.

Plantulele crescute din semințe neiradiate și neinfectate cu virusul mozaicului dungat al orzului au servit în calitate de martor. Fiecare variantă experimentală a inclus 100 plante aflate în aceeași fază ontogenetică. Toate boabele formate în spiculețe au fost colectate pentru studiile ulterioare. Circa 100 semințe din fiecare variantă experimentală au fost germinate în cutii Petri pe discuri din hârtie de filtru îmbibate cu apă distilată pentru evaluarea capacității de germinare a semințelor. Altele, cca 50 semințe, au fost utilizate pentru studiul schimburilor între cromatidele surori, indice aplicat în stabilirea efectului mutagen al factorilor. Analiza schimburilor între cromatidele surori se bazează pe încorporarea diferențiată a 5-brom 2-deoxyuridinei (BrdU) în segmentele cromatidice. În acest scop semințele loturilor experimentale au fost germinate la întuneric până la atingerea lungimii de 2...3 cm. Încorporarea BrdU a fost realizată pe parcursul a două cicluri celulare prin etalare pe discuri expuse în amestec de 100 μM BrdU, 0,1 μM fluorodeoxyuridină și 5 μM uridină. Procedura de fixare, macerare a materialului a fost selectată conform tehnicii de colorare Schiff. Restul semințelor, în totalitate, au fost ulterior semănate în câmp pentru obținerea generației I descendente de la plantele virus infectate.

Conform rezultatelor prezentate în tab. 1 se constată, că efectul razelor gamma în doză de 150 Gy asociat cu cel al virusului mozaicului dungat al orzului conduce la modificări nesemnificative ale capacității de germinare a semințelor, ceea ce constituie un moment esențial în realizarea sarcinii de obținere a descendenților.

Tabelul 1

Capacitatea de germinare a semințelor de orz de primăvară infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului și supuse iradierii

Soiul analizat	1	2	3
Galactic	87,96±8,52	59,81±7,11*	64,12±9,26
Sonor	79,55±12,98	65,97±9,38	5360±8,58
Unirea	83,88±9,66	57,99±4,14	79,15±16,63

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

- schema experimentului: 1 – plantule crescute din semințe netratate cu raze gamma și neinfectate cu virusul mozaicului dungat al orzului (martor); 2 – plantule infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului (cea mai apropiată soluție); 3 – plantule crescute din semințe iradiate cu raze gamma în doza de 150 Gy și infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului (invenția propusă).

Rezultatele studiului schimburilor între cromatidele surori atestă genotoxicitatea virusului mozaicului dungat al orzului în complex cu razele gamma, exprimată prin majorarea semnificativă a numărului de schimburi între cromatidele surori (tab. 2). La toate cele trei soiuri de orz de primăvară analizate frecvența schimburilor cromatidice a deținut valori de 1,34...1,45 ori mai majore decât la martor.

Tabelul 2

Frecvența schimburilor între cromatidele surori induse de virusul mozaicului dungat al orzului la plantele iradiate cu raze gamma

Varianta experimentală	Soiul analizat		
	Galactic	Sonor	Unirea
1	6,108±0,265	6,128±0,337	5,561±0,259
2	8,703±0,312***	8,359±0,299***	8,641±0,286***
3	9,054±0,274***	8,385±0,281***	8,081±0,246***

*** - diferențe semnificative față de martor pentru $P \leq 0,001$

Impactul asociat al razelor gamma și al infecției virale asupra materialului genetic denotă posibilitatea utilizării acestor factori în mutageneza experimentală în scopul extinderii variabilității genetice.

Analiza indicilor morfologici ai descendenților primei generații provenite de la plantele virusate și derivate din semințe iradiate a scos în evidență devierea de la tipul inițial a caracterelor cantitative (tabelul 3).

Tabelul 3

Coeficientul de variație a unor caractere cantitative la orzul de primăvară

Nr.	Caracterul analizat	Soiul Galactic			Soiul Sonor			Soiul Unirea		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	Talia plantei, cm	5,54	9,42	17,64	10,83	9,69	12,45	8,99	13,57	14,20
2	Talia ultimului internod, cm	27,18	21,04	29,39	21,69	18,40	18,01	24,66	28,28	25,46
3	Spiculețe dezvoltate, nr.	27,77	51,32	56,92	21,70	37,54	51,41	28,67	44,17	48,96
4	Spiculețe nedevelopate, nr.	35,16	39,87	44,84	43,22	48,07	39,94	48,45	53,29	46,66
5	Lungimea spicului, cm	15,29	9,06	13,02	11,39	13,75	13,48	10,22	11,84	12,35
6	Internoduri, nr.	42,58	7,57	12,04	9,17	14,04	7,63	30,87	10,24	13,77
7	Frați sterili, nr.	48,0	46,66	50,82	64,43	63,77	56,63	41,77	75,40	89,96
8	Frați fertili, nr.	44,95	44,03	54,69	38,03	37,71	46,14	45,87	39,84	39,89

Rezultatele prezentate în tab. 3 relevă modificări semnificative ale coeficientului de variație a taliei plantelor, lungimii spicului, numărului de spiculețe, numărului de frați. Conform invenției se menționează obținerea de forme cu talia mai joasă cu 9...19% decât la soiurile inițiale. Astfel, la soiul *Galactic* au fost remarcate exemplare cu talia minimă de cca 40 cm. Asemenea forme au fost obținute și la soiul *Sonor* și *Unirea*, în timp ce la soiurile inițiale înălțimea minimă a plantelor a fost de cel puțin 50...51 cm. Realizarea evaluărilor individuale a permis de a selecta exemplare cu talia joasă și indici ce determină productivitatea (lungimea spicului, numărul de spiculețe etc.) la nivelul soiului inițial. Diminuarea taliei plantelor a fost legată de reducerea numărului de internoduri. Trebuie de remarcat că formele pitice la orz prezintă un interes deosebit pentru amelioratori.

Valoarea intervalului de variație a fiecărui caracter analizat s-a dovedit a fi specifică soiului. Cel mai mare număr de spiculețe dezvoltate (25) a fost atestat la soiul *Galactic* în varianta cu aplicarea virusului mozaicului dungat al orzului și a razelor gamma în doză de 150 Gy. De asemenea, soiul *Galactic* a prezentat o superioritate față de celelalte două soiuri în referință la plasticitate, precum și la caracterele cantitative, cum ar fi numărul de internoduri, lungimea spicului.

Din datele evaluării caracterelor biomorfologice ale descendenților primei generații obținute de la plante infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului crescute din semințe iradiate sunt confirmate de rezultatele studiului citologic al schimbărilor cromatidice.

Majorarea frecvenței recombinării mitotice stabilite în urma aplicării procedurii propuse permite obținerea de noi combinații de caractere, obținerea cărora pe căi tradiționale este limitată de bariere biologice.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. SU 933052 1982.06.07

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară care include iradierea semințelor cu raze gamma în doză de 150 Gy, semănarea lor peste 2 zile, infectarea plantelor în faza de 2...3 frunze cu virusul mozaicului dungat al orzului în două repetări la interval de două zile, colectarea semințelor formate în spice, semănarea semințelor colectate și obținerea din ele a recombinanților de orz de primăvară.

Șef Secție:

Stah

COLESNIC Inesa

Examinator:

Bantaș

BANTAȘ Valentina

Redactor:

M. Lozovanu

LOZOVANU Maria

(54) Process for the obtaining of spring barley recombinants

(57) Abstract:

1
The invention relates to agricultural biotechnology, namely to a process for the obtaining of spring barley recombinants.

The process includes irradiation of seeds with gamma rays in a dose of 150 Gray, sowing thereof in 2 days, infection of plants in the phase of 2...3 leaves with the barley stripe mosaic virus twice with an interval of two

2
5 days, harvesting of the formed into ear seeds, sowing of the harvested seeds and obtaining therefrom of spring barley recombinants.

The result of the invention is to increase the number of spring barley recombinants with a large spectrum of quantitative traits.

10
Claims: 1

(54) Способ получения рекомбинантов ярового ячменя

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к сельскохозяйственной биотехнологии, а именно к способу получения рекомбинантов ярового ячменя.

Способ включает облучение семян гамма-лучами в дозе 150 Грей, их посев через 2 дня, инфицирование растений в фазе 2...3 листьев вирусом штриховатой мозаики ячменя дважды с интервалом в два

2
5 дня, сбор сформировавшихся в колосьях семян, посев собранных семян и получение из них рекомбинантов ярового ячменя.

Результат изобретения заключается в увеличении числа рекомбинантов ярового ячменя с расширенным спектром количественных признаков.

10
П. формулы: 1



REPUBLICA MOLDOVA

AGEPI

AGENȚIA DE STAT
PENTRU
PROPRIETATEA
INTELECTUALĂ

BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. 461

ÎN TEMEIUL LEGII PRIVIND PROTECȚIA INVENȚIILOR, AGENȚIA DE STAT PENTRU
PROPRIETATEA INTELECTUALĂ ELIBEREAZĂ PREZENTUL BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

Procedeu de obținere a somaclonelor de varză

Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE
A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A
MOLDOVEI, MD

Data depozit: 2011.06.03

DESCRIEREA INVENȚIEI, REVENDICĂRILE ȘI DESENELE CONSTITUIE PARTE
INTEGRANTĂ A PREZENTULUI BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ

CONFIRM PRIN SEMNARE ȘI APLICAREA SIGILIULUI

DIRECTOR GENERAL

CHIȘINĂU



MD 461 Z 2012.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **461** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *A01H 4/00* (2006.01)
A01H 1/04 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12R 1/94 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2011 0099 (22) Data depozit: 2011.06.03	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2012.01.31, BOPI nr. 1/2012
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventator: ANDRONIC Larisa, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Procedeu de obținere a somaclonelor de varză**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de obținere a somaclonelor de varză.

Procedeul include infectarea mecanică a plantelor în faza de două frunzulițe cotiledonate cu virusul mozaicului conopidei, colectarea explantelor de țesut mezofil din sectoarele învecinate zonelor clorotice, sterilizarea lor, inocularea explantelor pe mediul nutritiv Murashige și Skoog, ce conține agar 7 g/l, chinetină 0,01 mg/l și suplimentar 6-benzilaminopurină 0,5 mg/l, acid naftilacetic 0,5 mg/l, cu incubarea ulterioară a lor la întuneric la temperatura de 25°C pentru inițierea formării calusului morfogen, apoi cu o foto-

2
perioadă de 16 ore la iluminare de 2000 lx și temperatura de 27°C, transferarea calusurilor morfogene pe medii nutritive proaspete cu obținerea somaclonelor și înrădăcinarea ulterioară a lor pe mediul nutritiv Murashige și Skoog, ce conține suplimentar acid naftilacetic 0,5 mg/l cu adaptarea ulterioară la condiții *ex-vitro* și plantarea în sol a somaclonelor.

5
10
15
Rezultatul invenției constă în sporirea variabilității somaclonale la varză și în posibilitatea selecției somaclonelor care posedă caractere cantitative, nespecifice pentru soiul inițial.

Revendicări: 1

MD 461 Y 2012.08.31

(54) Process for the production of cabbage somaclones

(57) Abstract:

1 The invention relates to biotechnology, in particular to a process for the production of cabbage somaclones.

The process includes the mechanical infection of plants in the phase of two cotyledonous leaves with the cauliflower mosaic virus, selection of mesophilic tissue explants from the chlorotic areas adjacent sectors, their sterilization, inoculation of explants in the Murashige-Skoog nutrient medium, containing 7 g/l of agar, 0.01 mg/l of kinetin and additionally 0.5 mg/l of 6-benzylaminopurine, 0.5 mg/l of naphthaleneacetic acid, followed by their incubation in the dark at the temperature of 25°C to initiate the formation of morphogenic callus, and then

2 with a photoperiod of 16 hours at the light of 2000 lx and the temperature of 27°C, transfer of morphogenic calluses to fresh nutrient media to obtain somaclones and their subsequent establishment in the Murashige-Skoog nutrient medium, containing additionally 0.5 mg/l of naphthaleneacetic acid, followed by adaptation to *ex-vitro* conditions and planting in soil of somaclones.

5 The result of the invention is to increase the somaclonal variation of cabbage and the possibility of selecting somaclones with quantitative traits, non-specific for the original variety.

10 Claims: 1

(54) Способ получения соматклонов капусты

(57) Реферат:

1 Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу получения соматклонов капусты.

Способ включает механическое инфицирование растений в фазе двух семядольных листьев вирусом мозаики цветной капусты, отбор эксплантов мезофильной ткани из секторов соседних хлорозным зонам, их стерилизацию, инокулирование эксплантов на питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую 7 г/л агара, 0,01 мг/л кинетина и дополнительно 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,5 мг/л нафтилуксусной кислоты, с последующим их инкубированием в темноте при температуре 25°C для инициации формирования морфогенного

2 каллуса, а затем с фотопериодом 16 часов при освещении 2000 лк и температуре 27°C, перенос морфогенных каллусов на свежие питательные среды с получением соматклонов и последующее их укоренение на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей дополнительно 0,5 мг/л нафтилуксусной кислоты с последующей адаптацией к условиям *ex-vitro* и посадку в почву соматклонов.

5 Результат изобретения состоит в повышении соматклональной изменчивости капусты и возможности отбора соматклонов, обладающих количественными признаками, неспецифическими для исходного сорта.

10 П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la un procedeu de obținere a somaclonelor de varză.

5 Este cunoscut procedeu tradițional de generare a diversității genetice prin tehnici de culturi de țesuturi ce are la bază variabilitatea somaclonală [1].

Conform procedeuului dat cultivarea *in vitro* a țesuturilor poate genera variații somaclonale, rata cărora pentru același genotip depinde de mai mulți factori. Procedeuul prevede selectarea minuțioasă a explantelor. Pentru culturile leguminoase, inclusiv cele din specia *Brassica*, sunt propuse diverse părți de organe, inclusiv frunzele tinere. Ulterior se prevede realizarea etapelor de regenerare și reconstrucție integrală a plantelor prin inducerea embriogenezei somatice (cultivarea pe medii nutritive în condiții *in vitro*). Variabilitatea genetică în sistemele *in vitro* este întâmplătoare și limitată. Totodată, în aceste condiții se constată sporirea procentului de monstruozi, ceea ce diminuează avantajul aplicării procedeuului de inducere a variabilității somaclonale în scopul creării de genotipuri cu noi caractere agronomice valoroase.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea și sporirea ratei de regeneranți de varză cu caractere noi, valoroase ce ar putea servi drept material inițial în ameliorarea soiurilor prin tehnici netradiționale.

Procedeuul de obținere a somaclonelor de varză, conform invenției, include infectarea mecanică a plantelor în faza de două frunzulițe cotiledonate cu virusul mozaic al conopidei, 20 colectarea explantelor de țesut mezofil din sectoarele învecinate zonelor clorotice, sterilizarea lor, inocularea explantelor pe mediul nutritiv Murashige și Skoog, ce conține agar 7 g/l, chinetină 0,01 mg/l și suplimentar 6-benzilaminopurină 0,5 mg/l, acid naftilacetic 0,5 mg/l, cu incubarea ulterioară a lor la întuneric la temperatura de 25°C pentru inițierea formării calusului morfogen, apoi cu o fotoperioadă de 16 ore la iluminare de 2000 lx și temperatura de 27°C, transferarea 25 calusurilor morfogene pe medii nutritive proaspete cu obținerea somaclonelor și înrădăcinarea ulterioară a lor pe mediul nutritiv Murashige și Skoog, ce conține suplimentar acid naftilacetic 0,5 mg/l cu adaptarea ulterioară la condiții *ex-vitro* și plantarea în sol a somaclonelor.

Noutatea invenției constă în utilizarea în calitate de explant pentru obținerea somaclonelor de varză a pieselor de țesut mezofilian derivate de la plante de varză infectate cu virusul mozaic al conopidei, ceea ce permite sporirea diversității generate de culturile *in vitro*.

Rezultatul invenției constă în sporirea variabilității somaclonale la varză și în posibilitatea selecției somaclonelor care posedă caractere cantitative, nespecifice pentru soiul inițial.

Exemplu de realizare a invenției

35 În cercetare au fost antrenate soiurile tardive de varză albă (*Brassica oleracea* L. var. capitata), sensibile față de virusul mozaic al conopidei (CaMV - virus ADNds, reprezentant al genului *Caulimovirus*): Zavadovskaia, Moldovanca și Amager.

Din fiecare genotip au fost sădite câte 30 plante. Jumătate din ele în faza de 2 frunze cotiledonate au fost infectate mecanic cu inoculul al CaMV, care a fost izolat din *Datura stramonium* și identificat prin analiza imunisorbentă (ELISA). Plantulele neinfectate au servit în calitate de martor, iar cele infectate au format varianta experimentală.

Pentru cultura *in vitro* au fost utilizate explantele de țesut mezofilian, învecinat zonelor clorotice, recoltate după 20 zile de la infectare de la plante ce au prezentat simptome externe de boală. Fragmentele de mezofil au fost ținute timp de 3 min în apă cu câteva picături de Tween-20 (0,1%), apoi clătite în apă curgătoare timp de 10 min. Piese recoltate au fost sterilizate timp de 15 min în soluție de hipoclorit de sodiu (diluție 1:1 a preparatului comercial „ACE” – apă distilată). După aseptizare, piesele au fost trecute prin 3 băi de apă sterilă, a câte 5 min în fiecare, pentru înlăturarea totală a clorului. Toate operațiunile de sterilizare a explantelor, precum și de inoculare pe medii de cultură, s-au desfășurat în condiții aseptice, în interiorul hotei cu flux laminar de aer steril. Vitrocultura a fost inițiată în eprubete, conținând câte 2 ml de mediu de cultură Murashige și Skoog ce conține 20 g/l zaharoză și 7 g/l agar, suplimentat cu 6-benzilaminopurină (BAP) – 0,5 mg/l, acid naftil-acetic (ANA) – 0,5 mg/l, chinetină – 0,01 mg/l, care s-a dovedit optim pentru toate trei genotipuri de varză analizate. Valoarea pH-ului mediului nutritiv a fost ajustată înainte de autoclavare până la 5,7. Pentru inducerea calusogenezei eprubetele au fost incubate la întuneric la temperatura de 25°C. Pe mediul respectiv la a 7...9-a zi după inoculare se observau inițieri de proliferare, după care explantele cu răspuns de calusare au fost transferate în condiții constante de temperatură cu o fotoperioadă de 16 ore, T 27°C și iluminare de 2000 lx. La fiecare 2...3 săptămâni se efectuau pasaje, respectând normele aseptice.

Calusurile ce au prezentat zone morfogene au fost transferate în flacoane Magenta ce conțineau 5 ml mediu de cultură proaspăt. În urma a 4-5 pasaje se dezvoltau regeneranți, care în faza de 2-3 frunzulițe adevărate erau transferați pe mediul de rizogeneză Murashige și Skoog suplimentat cu ANA (0,5 mg/l). La 6...7 zile după pasaj pe acest mediu regeneranții prezentau un sistem

radicular cu perișori absorbant bine dezvoltat. După care plantulele erau transferate în vase de plastic de 500 ml cu amestec de sol:turbă (1:3). Vasele cu plantule se acopereau cu peliculă de polietilenă și se transferau în camera de cultură la 25...27°C și cu o fotoperioadă de 16 ore pentru adaptare *ex-vitro*. La apariția primei frunzulițe noi regeneranții erau plantați în sol conform tehnicilor standard.

Schema experimentului a cuprins două variante: 1 – regeneranți obținuți din fragmente de țesut mezofilian recoltate de la plante martor; 2 – regeneranți obținuți din fragmente de țesut mezofilian alăturat sectoarelor învecinate zonelor clorotice colectate de la plante infectate cu CaMV.

Conform rezultatelor prezentate în tabelul 1 se constată, că efectul indus de infecția virală nu generează reducerea semnificativă a frecvenței regenerării, ceea ce permite obținerea unui număr esențial de regeneranți.

Tabelul 1

Frecvența regenerării *in vitro* la soiurile de varză albă (*Brasica oleracea* L. var. capitata) infectate cu virusul mozaicului conopidei (CaMV)

Genotipul analizat	Varianta	Frecvența regenerării
Amager	1	69,84±1,58
	2	56,67±3,33
Moldovanca	1	54,62±2,91
	2	46,63±1,71
Zavadovscaia	1	59,16±2,86
	2	55,83±4,06

Variabilitatea morfologică a regeneranților a fost evaluată după un șir de caractere morfologice: lățimea și lungimea frunzei, precum și coraportul acestor doi indici; numărul de frunzulițe; lungimea rădăcinii și tulpinii; conținutul de substanțe uscate.

Deosebiri statistic confirmate între valorile medii ale indicilor morfologici analizați au fost estimate pentru valorile statistice ale frunzulițelor, în timp ce coraportul dintre acești indici a rămas fără modificare (tabelul 2).

Tabelul 2

Valorile medii ale unor caractere morfologice la regeneranții de varză derivați prin cultivare *in vitro*

Indicii morfologici	Soiul Amager		Soiul Moldovanca		Soiul Zavadovscaia	
	1	2	1	2	1	2
Lungimea unei frunzulițe (mm)	37,73±2,04	29,91±2,23	38,36±2,02	30,36±2,09	37,54±2,08	32,09±2,0
Lățimea unei frunzulițe (mm)	29,64±1,77	24,45±1,59	29,82±1,59	24,09±1,55	28,81±1,63	24,82±1,4
Coraportul lățime/lungime	0,78±0,02	0,83±0,01	0,78±0,02	0,80±0,24	0,77±0,03	0,78±0,02
Frunzulițe per regenerant (număr)	4,09±0,25	4,18±0,23	4,27±0,195	4,45±0,25	4,36±0,27	4,82±0,33
Lungimea rădăcinii (mm)	14,32±1,16	13,81±1,39	14,77±1,15	13,82±1,40	14,65±1,14	14,03±1,4
Lungimea tulpinii (mm)	1,93±0,14	2,67±0,19	1,98±0,13	2,64±0,19	1,98±0,15	2,65±0,19
Conținutul substanțelor uscate (%)	12,02±0,81	13,93±1,77	11,99±0,76	14,10±2,24	12,26±0,47	13,97±1,8

Variabilitatea sporită a unor caractere denotă inducerea unor clase noi de indivizi cu valori netipice soiului inițial, precum și celor obținuți pe cale biotehnologică tradițională.

- 5 Destabilizarea valorilor coeficientului de variație a unor caractere cantitative și inducerea unor noi clase fenotipice în cadrul soiurilor analizate de varză albă în urma aplicării procedurii propus denotă posibilitatea utilizării infecției produse de virusul mozaicului conopidei în calitate de inductor al variabilității somaclonale.

10

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. În vitro technology for mutation breeding. A technical document issued by the International Atomic Energy Agency, IAEA-TECDOC 392, Vienna, 1986, p. 9-10, 12-14, 34, 47

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a somaclonelor de varză care include infectarea mecanică a plantelor în faza de două frunzulițe cotiledonate cu virusul mozaicului conopidei, colectarea explantelor de țesut mezofil din sectoarele învecinate zonelor clorotice, sterilizarea lor, inocularea explantelor pe mediul nutritiv Murashige și Skoog, ce conține agar 7 g/l, chinetină 0,01 mg/l și suplimentar 6-benzilaminopurină 0,5 mg/l, acid naftilacetic 0,5 mg/l, cu incubarea ulterioară a lor la întuneric la temperatura de 25°C pentru inițierea formării calusului morfogen, apoi cu o fotoperioadă de 16 ore la iluminare de 2000 lx și temperatura de 27°C, transferarea calusurilor morfogene pe medii nutritive proaspete cu obținerea somaclonelor și înrădăcinarea ulterioară a lor pe mediul nutritiv Murashige și Skoog, ce conține suplimentar acid naftilacetic 0,5 mg/l cu adaptarea ulterioară la condiții *ex-vitro* și plantarea în sol a somaclonelor.

aia

2

,09±2,0

,82±1,4

78±0,02

82±0,33

1,03±1,4

65±0,19

3,97±1,8

Şef Secție:

/ Examinator:

Redactor:

COLESNIC Inesa

BANTAȘ Valentina

LOZOVANU Maria



REPUBLICA MOLDOVA

Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET PENTRU SOI DE PLANTĂ

Nr. 276

Eliberat în temeiul Legii nr. 39/2008 privind protecția soiurilor de plante

Denumirea comună: **TOMATE**

Taxonul botanic: ***Solanum lycopersicum* L.**

Denumirea soiului: **ANONA**

Titular: **INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A
PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**

Data acordării: **2018.06.30**

Descrierea soiului constituie parte integrantă a prezentului
brevet pentru soi de plantă

Director General

L. Iobag



CHIȘINĂU



MD 276 2018.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



Agencia de Stat
pentru Protectia Proprietății Intelectuale

MD 276

BREVET PENTRU SOI DE PLANTĂ

Nr. depozit: v 2015 0014 Data depozit: 2015.02.13	Data publicării cererii de brevet: 2015.05.31, BOPI nr. 5/2015 Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.06.30, BOPI nr. 6/2018
Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD Amelioratori: MĂRÎI Liliana, MD; BUJOREANU Valeriu, MD; ANDRONIC Larisa, MD; SMEREA Svetlana, MD; BOTNARI Vasile, MD Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

Denumirea comună: TOMATE

Taxonul botanic: *Solanum lycopersicum* L.

Denumirea soiului: ANONA

Numărul și data Ghidului de Testare: TG/44/11 Rev. (2011-10-20+2013-03-20) UPOV

Autoritatea care a efectuat testarea: Comisia de Stat pentru Testarea Soiurilor de Plante, MD

Locul efectuării testării: Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM, MD

Perioada efectuării testării: 2016-2017

Data întocmirii raportului de examinare tehnică: 2018.02.07

MD 276 2018.10.31

Descrierea oficială a soiului

Denumirea comună:

TOMATE

Taxonul botanic:

***Solanum lycopersicum* L.**

Denumirea soiului:

ANONA

Numărul și data Ghidului de Testare:

TG/44/11 Rev. (2011-10-20+2013-03-20) UPOV

Nr.	Caracterul	Gradul de expresie	Nota
1	Numai pentru soiuri reproduse pe cale sexuată: Răsadul: culoarea antocianică a hipocotilului	prezentă	9
2	Planta: tipul de creștere	determinat	1
3	Numai pentru soiuri cu tipul de creștere determinat: numărul de inflorescențe pe tulpina principală	puține	3
4	Tulpina: culoarea antocianică	absentă	1
7	Frunza: portul	semi-atârnată	7
8	Frunza: lungimea	medie	5
9	Frunza: lățimea	medie	5
10	Frunza: tipul limbului	bipenat	2
11	Frunza: mărimea frunzulițelor	mici	3
12	Frunza: intensitatea culorii verzi	verde medie	5
13	Frunza: luciul	slab	3
14	Frunza: bășicarea	slabă	3
15	Frunza: poziția pețiolului în raport cu axul central	orizontal	5
16	Inflorescența: tipul	simplă	1
17	Floarea: culoarea	galbenă	1
18	Floarea: pubescenta stilului	prezentă	9
19	Pedunculul: stratul despărțitor	prezent	9
20	Numai pentru soiuri cu strat despărțitor: Pedicelul: lungimea	mediu	5
21	Fructul: pata verde la bază (înainte de maturitate)	prezentă	9
22	Fructul: extensiunea petei verzi (înainte de maturitate)	medie	5
23	Fructul: intensitatea culorii verzi a petei (înainte de maturitate)	medie	5
24	Fructul: intensitatea culorii verzi excluzând pata (înainte de maturitate)	deschisă	3
25	Fructul: dungile verzi (înainte de maturitate)	absente	1
26	Fructul: dimensiunea	mic spre mediu	3
27	Fructul: raportul lungime/diametru	mediu	5
28	Fructul: forma în secțiune longitudinală	oblong	4
29	Fructul: cutele la nivelul pedunculului	absente sau foarte slabe	1
30	Fructul: depresiunea la nivelul pedunculului	slabă	3
31	Fructul: dimensiunea cicatricei pedunculului	foarte mică	1
32	Fructul: mărimea cicatricei pistilului	foarte mică	1
33	Fructul: forma vârfului	plat	3
34	Fructul: diametrul miezului în secțiune transversală în raport cu diametrul total	mic	3
35	Fructul: grosimea pericarpului	subțire	3
36	Fructul: numărul de loje seminale	2 sau 3	2

37	Fructul: culoarea (la maturitate)	roșu	5
38	Fructul: culoarea pulpei (la maturitate)	roșie	5
39	Fructul: luciul pielei	slab	1
40	Fructul: culoarea epidermei	galbenă	2
41	Fructul: fermitatea	medie	3
43	Epoca de înflorire	timpurie	3
44	Epoca de maturitate	foarte precoce	1



REPUBLICA MOLDOVA

Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET

PENTRU SOI DE PLANTĂ

Nr. 277

Eliberat în temeiul Legii nr. 39/2008 privind protecția soiurilor de plante

Denumirea comună: **TOMATE**

Taxonul botanic: ***Solanum lycopersicum* L.**

Denumirea soiului: **CisGen**

Titular: **INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A
PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**

Data acordării: **2018.06.30**

Descrierea soiului constituie parte integrantă a prezentului
brevet pentru soi de plantă

Director General



CHIȘINĂU



MD 277 2018.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Intelectuale

MD 277

BREVET PENTRU SOI DE PLANTĂ

Nr. depozit: v 2015 0015 Data depozit: 2015.02.13	Data publicării cererii de brevet: 2015.05.31, BOPI nr. 5/2015 Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.06.30, BOPI nr. 6/2018
Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD Amelioratori: MĂRÎI Liliana, MD; BUJOREANU Valeriu, MD; ANDRONIC Larisa, MD; SMEREA Svetlana, MD; BOTNARI Vasile, MD; BERZOI Valentina, MD Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

Denumirea comună: TOMATE

Taxonul botanic: *Solanum lycopersicum* L.

Denumirea soiului: CisGen

Numărul și data Ghidului de Testare: TG/44/11 Rev. (2011-10-20+2013-03-20) UPOV

Autoritatea care a efectuat testarea: Comisia de Stat pentru Testarea Soiurilor de Plante, MD

Locul efectuării testării: Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM, MD

Perioada efectuării testării: 2016-2017

Data întocmirii raportului de examinare tehnică: 2018.02.07

Descrierea oficială a soiului

Denumirea comună:

TOMATE

Taxonul botanic:

***Solanum lycopersicum* L.**

Denumirea soiului:

CisGen

Numărul și data Ghidului de Testare:

TG/44/11 Rev. (2011-10-20+2013-03-20) UPOV

Nr.	Caracterul	Gradul de expresie	Nota
1	Numai pentru soiuri reproduse pe cale sexuată: Răsadul: culoarea antocianică a hipocotilului	prezentă	9
2	Planta: tipul de creștere	determinat	1
3	Numai pentru soiuri cu tipul de creștere determinat: numărul de inflorescențe pe tulpina principală	puține	3
4	Tulpina: culoarea antocianică	absentă	1
7	Frunza: portul	semierectă	3
8	Frunza: lungimea	medie	5
9	Frunza: lățimea	îngustă	3
10	Frunza: tipul limbului	bipenat	2
11	Frunza: mărimea frunzulițelor	medii	5
12	Frunza: intensitatea culorii verzi	verde închisă	7
13	Frunza: luciul	slab	3
14	Frunza: bășicarea	slabă	3
15	Frunza: poziția pețiolului în raport cu axul central	orizontal	5
16	Inflorescența: tipul	simplă	1
17	Floarea: culoarea	galbenă	1
18	Floarea: pubescența stilului	prezentă	9
19	Pedunculul: stratul despărțitor	prezent	9
20	Numai pentru soiuri cu strat despărțitor: Pedicelul: lungimea	mediu	5
21	Fructul: pata verde la bază (înainte de maturitate)	absentă	1
22	Fructul: extensiunea petei verzi (înainte de maturitate)	foarte mică	1
23	Fructul: intensitatea culorii verzi a petei (înainte de maturitate)	medie	5
24	Fructul: intensitatea culorii verzi excluzând pata (înainte de maturitate)	medie	5
25	Fructul: dungile verzi (înainte de maturitate)	absente	1
26	Fructul: dimensiunea	mic	3
27	Fructul: raportul lungime/diametru	mult alungit	9
28	Fructul: forma în secțiune longitudinală	obovat	9
29	Fructul: cutele la nivelul pedunculului	slabe	3
30	Fructul: depresiunea la nivelul pedunculului	medie	5
31	Fructul: dimensiunea cicatricei pedunculului	foarte mică	1
32	Fructul: mărimea cicatricei pistilului	foarte mică	1
33	Fructul: forma vârfului	plat	3
34	Fructul: diametrul miezului în secțiune transversală în raport cu diametrul total	foarte mic	1
35	Fructul: grosimea pericarpului	subțire	3

36	Fructul: numărul de loje seminale	2	1
37	Fructul: culoarea (la maturitate)	roșu	5
38	Fructul: culoarea pulpei (la maturitate)	roșie	5
39	Fructul: luciul pielii	slab	1
40	Fructul: culoarea epidermei	galbenă	2
41	Fructul: fermitatea	medie	5
43	Epoca de înflorire	timpurie	3
44	Epoca de maturitate	foarte precoce	1

Aprob
 Directorul adjunct al Institutului de Genetică,
 Fiziologie și Protecție a Plantelor
 Dna SMEREA Syetlana, dr. biol.



Act de implementare

Prin prezenta se confirmă transmiterea în depozitoriul Băncii de gene a Laboratorului Resurse Genetice Vegetale, a liniilor de tomate (Fachel 9/9 și Fachel 6/9) obținute din populațiile soiului Fachel descendente de la plante infectate cu virusul aspermiei tomatelor în urma selectărilor și evaluărilor individuale. Cercetările au fost realizate de către ANDRONIC Larisa cercet. șt. coord. în cadrul Laboratorului Biotehnologii Vegetale. Liniile de tomate Fachel 9/9 și Fachel 6/9 se disting de genotipul inițial prin îmbinarea caracterelor valoroase, precum masa fructului, conținut ridicat de substanțe uscate, număr redus de semințe și rezistență sporită la factori biotici (bacterioze, stolbur). Liniile date sunt de perspectivă pentru ameliorare și studii fitopatologice.

Șef lab. Resurse Genetice Vegetale

GANEA Anatolie, dr., conf. cercet.

Șef. Lab. Biotehnologii Vegetale

MĂRÎI Liliana, dr., conf. cercet.

Cercet. șt. coordonator

ANDRONIC Larisa, dr., conf. cercet.

03.11.2019

nr. 05/cu-88 din. 26.05.2020

ACT DE IMPLEMENTARE A REZULTATELOR ȘTIINȚIFICE

Prin prezenta se confirmă că rezultatele investigațiilor științifice efectuate în cadrul tezei de doctor habilitat în biologie cu tema "**Citogenetica procesului de patogeneză virală la plantele de cultură**" a d-nei ANDRONIC Larisa au fost implementate în curriculum universitar pentru licență a disciplinelor "*Biologie celulară*" și "*Histologie*" la Departamentul Științe Biologice și Geomice al Universității de Stat „Dimitrie Cantemir”.

Prim-Prorector



ROTARU Liliana, dr., conf. univ.

Facultatea Științe Fundamentale,
Decan

ELENCIUC Daniela, dr., conf. univ.

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teză sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Andronic Larisa

Semnătura



Data 16.11.2020

INFORMAȚII PERSONALE

Andronic Larisa



✉ andronic.larisa@yahoo.com

Sexul F | Data nașterii 17/03/1964 | Naționalitatea MDA

LOCUL DE MUNCA

I.P. Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor

EXPERIENȚA PROFESIONALĂ

- | | |
|-------------|---|
| 2019 | • Director al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor |
| 2013 – 2018 | • director adjunct pe probleme științifice al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor |
| 2010 – 2013 | • director adjunct pe probleme științifice al Institutului de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM |
| 2005 – 2010 | • consultant, Consiliul Național pentru Acreditare și Atestare, Direcția generală de atestare, secția științe reale |
| 1999 – 2005 | • cercetător științific coordonator, Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor, AȘM |
| 1996 – 1999 | • cercetător științific superior, Institutul de Genetică al AȘM |
| 1996 – 1991 | • cercetător științific, Institutul de Genetică al AȘM |
| 1990 – 1987 | • doctorand, Institutul de Genetică al AȘM |
| 1987 – 1986 | • laborant, Institutul de Genetică al AȘM. |

EDUCAȚIE ȘI FORMARE

- | | |
|-------------|---|
| 1981 – 1986 | Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Biologie și Pedologie, studii superioare, biolog (diplomă cu mențiune, B-I, Nr. 515939, 27 iunie 1986) |
| 1987 – 1991 | Institutul de Genetică al AȘM, studii doctorale, doctor în științe biologice (diploma seria KD N 062000, Moscova) |
| 2009 - 2010 | Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM, studii postdoctorale |

COMPETENTE PERSONALE

Limba maternă Limba română

Alte limbi străine cunoscute

INTELEGERE		VORBIRE		SCRIERE
Ascultare	Citare	Participare la conversație	Discurs oral	

Limba rusă	C	C	C	C	C
Limba engleză	B2	B1	B1	B1	B2

Competențe organizaționale/managieriale

2019	Director al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor
2010 - 2018	Director adjunct pe probleme științifice al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.
2005 – 2010	Consultant, Consiliul Național pentru Acreditare și Atestare, Direcția generală de atestare, secția științe reale (domeniile biologie, geografie, agricultură, medicină veterinară).
2006 - 2008	Secretar științific al Programului de Stat „Principii și procedee tehnologice de diminuare a consecințelor calamităților naturale (secetă, înghețuri etc.) asupra plantelor de cultură”.
2004 – 2005	Secretar științific al Consiliului Științific Specializat, specialitățile: 03.00.15 - Genetică, 06.01.05 - Ameliorarea și producerea semințelor.
1996 – prezent	Secretar științific al Societății Republicane de Microscopie Electronică.

Activitatea de expertiză și consultanță

2018	Secretar științific al Comisiei de experți în științe biologice a Agenției Naționale de Asigurare a Calității în Educație și Cercetare.
2018	Evaluator al programelor de studii superioare de licență în cadrul Agenției Naționale de Asigurare a Calității în Educație și Cercetare.
2014 - 2017	Secretar științific al Comisiei unificate de experți în științe biologice și medicale a Consiliului Național pentru Acreditare și Atestare.
2012 – 2017	Secretar științific al Comisiei de experți în Biologie a Consiliului Național pentru Acreditare și Atestare.
2011 - 2016	Expert al Consiliului Consultativ de expertiză al CSSDT.
2012 - prezent	Secretar responsabil al revistei Buletinul AȘM, seria Științele vieții, compartimentul Genetica, Biologia moleculară și Ameliorarea.
2011 - prezent	Recenzent al revistelor <i>Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology</i> (ISSN 2141 - 226X), <i>Journal of Agricultural Science and Technology A & Journal of Agricultural Science and Technology B</i> (ISSN 1939-1250), USA pe probleme din domeniul citogenetice.

Activitatea didactică

2010 – prezent	Conferențiar universitar, catedra Biologie, facultatea Științe ale Naturii, Universitatea de Stat Dimitrie Cantemir (Universitatea Academiei de Științe a Moldovei), disciplinele Biologie celulară, Histologie vegetală, Metode citologice de studiu a celulelor și țesuturilor.
2007 - 2009	Conferențiar universitar, catedra Biologie vegetală, facultatea Biologie și Pedologie, USM, disciplina Biologie celulară.

Competențe dobândite la locul de muncă

- specialist calificat în citogenetică;
- tehnici de studiu a relațiilor gazdă-patogen;
- mecanisme de inducere și cuantificare a variabilității genetice la plantele de cultură;
- variabilitatea somaclonală și metode biotehnologice de inducere a biodiversității;
- manipulări biotehnologice de obținere a materialului liber de virusuri;
- managementul sferei științei și inovării în condițiile economiei de piață;
- politici și strategii în domeniul pregătirii cadrelor științifice de înaltă calificare.

Competențe informatice

- o bună cunoaștere a instrumentelor Microsoft Office™

Alte competențe

2001

Cursurile "Account in the Base of National Standards. Computering implementation", Programul TACIS, Centrul de Business din Moldova. Cursurile „Contabilitatea în Baza Standardelor Naționale. Aplicații computerizate pentru contabilitate” conform Programului TACIS în cadrul Centrului de Business din Moldova.

2017

Cursul practic "Scrierea Proiectelor de Cercetare la H2020", TSI Consultant&Training SRL (Proiect ContraPlus®).

INFORMATII SUPLIMENTARE

Publicații

Rezultatele științifice sunt publicate în peste **150** lucrări științifice, inclusiv: **1** lucrare metodică, **2** capitole în monografii, **5** articole în reviste cu factor de impact, **10** articole în diferite reviste științifice internaționale, **13** articole în reviste naționale de profil categoria B/C, **15** articole în culegeri științifice internaționale, **13** articole în culegeri de lucrări ale conferințelor naționale, **42** materiale/ teze la conferințe/simpozioane științifice internaționale (peste hotare) și în republică; **3** lucrări electronice, **18** articole de popularizare a științei, **6** brevete de invenții, **2** brevete pentru soi de plantă, **1** adeverință de soi de plantă. Realizările științifice au fost expuse și aprobate la **25/22** foruri științifice naționale/internaționale.

Rezultatele inovaționale au fost apreciate la saloane naționale/internaționale de invenție cu **12** medalii de aur, **3** argint și **1** bronz, **3** diplome de excelență.

Cele mai importante lucrări științifice:

Manual

Andronic L. Biologie celulară. Chișinău, 2017, Tip. Biotehdesign, 207 p. ISBN 978-9975-108-21-8

Articole de sinteză în reviste științifice cu factor de impact

Chiriac Gh. I., **Andronic L.**, Bujoreanu V.V., Marii L. I. Features of crossing-over in virus-infected tomato. Central European Journal of Biology, 2006, Vol.1, Nr.3, pp.386-398 (FI 0.662).

Andronic L., Jacota A.G., Bujoreanu V.V., Grigorov T.B. Genotoxicity of barley stripe mosaic virus in infected host plants. Central European Journal of Biology, 2010. Vol.5, nr.5, p.633-640 (FI impact 0.915).

Smerea S., **Andronic L.**, Grigorov T., Bujoreanu V. *In vitro* regenerative genotypic specificity of meristems from virus infected grapevine cultivars. Romanian Biotechnological Letters, 2010. Vol. 15, nr.2, p.19-25 (categoria A, România, FI 0.333).

Publicații **Andronic L.** Viruses as trigger of DNA damage in host plants. Canadian Journal of Plant Science. Canadian Journal of Plant Science, 2012, 92(6), 1083-1091. ISSN 0008-4220. doi: 10.4141/cjps2011-197 (FI: 0,61).

Andronic L., Smerea S., Macovei E. *In vitro* response of anthers from different barley genotypes in order to obtain haploid plants. Romanian Agricultural Research, nr. 32, 2015, p. 3-10, DII 2067-5720 RAR 2015-11, ISSN 1222 – 4227 (FI 0,485).

Articole în reviste științifice internaționale

Андроник Л.И. Полиморфизм гордеинов в популяциях ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.), полученных от вирус-инфицированных родительских форм. Плодоводство и ягодоводство России. Том XXXIV, часть 1, 2012, с. 17-23. ISSN: 2073-4948.

Smerea S., **Andronic L.** The increasing of the *in vitro* multiplication rate for grapevine genotypes by application of low-intensity millimeter waves. Lucrări științifice. Seria horticultură. Institutul Agronomie "Ion Ionescu de la Brad." Iași 2015, 52(2), p.45-50.

Андроник Л.И., Балашова И.Т., Бужоряну В.В., Смеря С. В. Специфические реакции разных генотипов томата *Solanum lycopersicum* L. на заражение вирусами. Плодоводство и ягодоводство России, 2017, том XXXVIII, часть I. с. 17-22, ISSN 2073-4948.

Articole în reviste științifice naționale, categoria B/C

Andronic L.I. Studiul variabilității somaclonale induse de virusul mozaicului conopidei la plantele gazdă. Analele USM, Studia Universitatis, Științe ale naturii, 2008. Vol. 7 (17), p.28-32.

Andronic L., Jacotă A. Evidența schimburilor între cromatidele surori la orz (*Hordeum vulgare* L.) în cazul infecției virale. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții, 2009, nr.2 (308), p.57-64.

Andronic L., Jacotă A., Grigorov T., Bujoreanu V. Studiul dividerilor mitotice în meristemele radiculare la orz în diverse condiții de patogeniza virală. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții, 2009, nr. 3(309), p. 74-81.

Andronic L.I. Evidence of meiotic recombination in virus infected tomato. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții, 2010, nr. 2(311), p. 8-16.

Andronic L., Rudacova A., Rotari A. Polimorfismul proteinelor de rezervă în populațiile orzului de primăvară (*Hordeum vulgare* L.) obținute în condiții de infecție virală. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții, 2011, nr. 1(313), p. 73-79.

Grigorov T., Smerea S., **Andronic L., Berzoi V.** Variabilitatea caracterelor cantitative la orz în generațiile M₀-M₃ la plantele supuse acțiunii infecției virale. Buletinul AȘM. Științele Vieții. 2013, 3 (321), p.83-89.

Andronic L., Macovei E., Smerea S. Ultrastructural evaluation and histological peculiarities of androgenetic structures of barley. Buletinul AȘM. Științele Vieții. 2015, 2 (326), p.53-58.

Andronic L., Port A., Duca M. Expression of some genes in barley under viral infection. Buletinul AȘM. Științele Vieții. 2015, 2 (326), p.59-65. **Andronic L., Bujoreanu V.** Virusurile tomatelor – citopatologie și diagnostic. Agricultura Moldovei, nr. 1-2, 2015, p.31-34.

Brevete de invenție

Procedeu de obținere a recombinanților la tomate **Andronic L., Jacotă ., Bujoreanu V.** Brevet de invenție nr.200 din 21.10.2009, MD BOPI nr.5, 2010

Procedeu de obținere a recombinanților de orz de primăvară. **Andronic L., Grigorov T., Bujoreanu V.** Brevet de invenție nr.251 din 22.04.2010, MD BOPI nr.8, 2010.

Procedeu de obținere a somaclonelor de varză. **Andronic L.** Brevet de invenție nr.461 din 03.06.2011, MD BOPI nr.1, 2012.

Procedeu de multiplicare microclonală a viței de vie. Smerea S., **Andronic L., Rotaru A.** Brevet de invenție nr.705 din 19.04.2013, MD BOPI nr.12, 2013

Procedeu de obținere a plantelor de viță de vie libere de virusul răsucirii frunzelor. Smerea S., **Andronic L.** Brevet de invenție nr. 847Z din 2015.07.31, MD BOPI nr.12, 2014.

Procedeu de inducere a haploizilor la orz. Smerea, S.; **Andronic, L.; Macovei, E.** Brevet de invenție nr.1090 din 2017.07.30.

Publicații

Brevet pentru soi de planta

Mărți L., Bujoreanu V., **Andronic L.**, Smerea S., Botnari V. Tomate (*Solanum lycopersicum* L.), soiul Anona. Nr. 276 din 2018.06.30.

Mărți L., Bujoreanu V., **Andronic L.**, Smerea S., Botnari V., Berzoi V. Tomate (*Solanum lycopersicum* L.), soiul CisGen. Nr. 277 din 2018.06.30.

Adeverință pentru soi de plantă

Mărți L., Bujoreanu V., **Andronic L.**, Smerea S., Botnari V., Berzoi V. Soi de tomate CisGen. Adeverință pentru soi de plantă nr.717.3. Soi inclus în Catalogul Soiurilor de Plante al Republicii Moldova în anul 2018, Chișinău, 2018, p.43.

Proiecte de cercetare

- 2015-2019 – director de proiect “Principii biotehnologice de studiu al interacțiunii dintre plantele de cultură și agenții virali” (proiect instituțional fundamental);
- 2012-2013 – director de proiect bilateral „Embriogeneză zigotică – procedeu biotehologic eficient de eradicare a virusurilor la soiurile apirene de viță de vie„ (#5383 STCU/ASM);
- 2009-2011 – executor în proiectul internațional „Crearea colecției de forme locale de viță de vie libere de virusuri cu rezistență la factori de mediu” (#4073 STCU);
- 2008-2010 – participant în proiectul internațional „Paradigma sinergetică a autoorganizării și organizării sistemului de cercetare-dezvoltare-inovare în Republica Moldova în perioada de tranziție la economia de piață în condițiile integrării europene” (#4082 STCU);
- 2006-2008 – executor în Programul de Stat „Principii și procedee tehnologice de diminuare a consecințelor calamităților naturale (secetă, înghețuri etc.) asupra plantelor de cultură”;
- 1996-1998 – executor în cadrul programei de colaborare Institutul de Genetică al AȘM / Universitatea din București (contract Nr. c.12-394, cu tema “Investigații imunologice și genetico-moleculare în modularea răspunsului imun”);
- executor a 4 proiecte instituționale:
 - 11.817.04.04F. *Biotehologii avansate și mecanisme genetice și fiziologice de inducere a variabilității genotipice și formarea unui potențial genetic sporit de productivitate și rezistență al C₃ și C₄ plantelor* (2010-2014).
 - 06.407.005.F. *Studiul variabilității genetice indusă de factori fizici, chimici și biologici in vivo și in vitro, evaluarea genetică și moleculară a caracterelor de productivitate, calitate și rezistență la condițiile nefavorabile ale mediului* (2006-2010).
 - 01.14.03F. *Impactul agenților fitopatogeni și bioreglatorilor naturali în inducerea și selectarea variabilității genetice la plante agricole cultivate in vitro și in vivo* (2001-2005).
 - Cercetarea mecanismelor de dirijarea a variabilității genetice la plante. Elaborarea a noi principii și tehnologii de evaluare și selectare a genotipurilor valoroase. Elaborarea metodelor eficiente de apreciere a productivității și rezistenței plantelor de cultură la factorii nefavorabili pe baza principiilor biotehnologice* (1996-2001).

Seminare științifice de profil	Membru al Seminarelor științifice de profil la specialitățile 162.01. <i>Genetica vegetală</i> , 411.04. <i>Ameliorarea plantelor și producerea semințelor</i> .
Asociații științifice	Membru al asociației internaționale a cercetării, educației și dezvoltării programelor "Agrobiodiversitatea pentru ameliorarea nutriției, sănătății și calității vieții". Certificat nr. 0137-2015 MD.
Titlu științific	Conferențiar cercetător, specialitatea <i>Genetică vegetală</i> (atestat seria CȘS N 0468, 2000, Chișinău).
Abilitare în dreptul de conducere a tezelor de doctorat	Pregătirea cadrelor de înaltă calificare științifică prin studii doctorale la specialitatea 162.01. <i>Genetică vegetală</i> (Hotărârea CA a CNAA nr.1168 din 5 octombrie 2011, certificatul de abilitare seria C, nr. 2842 din 26.03.2018, Decizia Consiliului de conducere ANACEC).
Distincții	
24 septembrie 2019	Medalia Jubiliară a Academiei de Științe Agricole și Silvici "Gheorghe Ionescu-Șisești", București, România
21 august 2019	Premiul Național pentru știință. Hotărârea de Guvern nr. 419, 21 august 2019, Monitorului Oficial nr. 261–268 din 23 august 2019.
23 mai 2019	Premiul „Cristalul Calității” și Diploma de Recunoștință a Agenției Naționale de Asigurare a Calității în Educație și Cercetare pentru promovarea culturii calității prin corectitudine, responsabilitate și profesionalism în activitatea de evaluare externă a programelor de studii.
26 noiembrie 2017	Medalia "Nicolae Miclescu Spătaru", pentru rezultate valoroase obținute în cercetare, managementul științei și pregătirea cadrelor de înaltă calificare. Hotărârea CSȘDT din 26.10.2017.
10 iunie 2016	Medalia "70 de ani de la crearea primelor institute de cercetare și a 55 de ani de la fondarea Academiei de Științe a Moldovei", pentru rezultate valoroase obținute în cercetare, managementul științei și pregătirea cadrelor de înaltă calificare. Legitimăție nr. 352. Dispoziția Președintelui AȘM nr.09-116 din 10 iunie 2016.
01 iulie 2015	Diploma Academiei de Științe a Moldovei cu prilejul Zilei Internaționale a Științei
20 martie 2014	Diplomă de recunoștință a Academiei de Științe a Moldovei.
10 noiembrie 2014	Diploma Consiliului Național pentru Acreditare și Atestare.
10 noiembrie 2014	Diploma Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor cu prilejul Zilei Internaționale a Științei pentru dezvoltarea colaborărilor cu instituții/organizații din sfera științei și inovării de peste hotare.
24 februarie 2011	Diplomă de recunoștință a Consiliului Național pentru Acreditare și Atestare pentru activitate fructuoasă și merite deosebite în pregătirea cadrelor de înaltă calificare științifică.