

Torremolinos, España. – 1980. Vol I. p. 74-82.

23. *Vrânceanu A.V., Pirova N., Stoenescu F.M., Pacureanu M.* Some aspects of the interaction *Helianthus annuus* L./*Orobanche cumana* Wallr. and its implication in sunflower breeding. // In Proceedings of a workshop on biology and control of *Orobanche*. Edited by S.J. Borg. Landbouwhogeschool, Wageningen, The Netherlands. 1986. p. 181-189.

24. *Vrânceanu A.V.* Floarea-soarelui hibridă. Editura: Ceres 2004. p.454-460, 599-609.

25. *Zélicourt A., Letousey P., Thoiron D. et al.* Ha-DEF1 a sunflower defensin induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. // *Planta*. 2007. Vol. 226, p. 591-600(10).

26. *Ляшенко И. Ф.* Генетика некоторых хозяйственно ценных признаков и свойств подсолнечника. // Автореферат, 1953, p.28.

27. *Палеев Н.Г.* Генетика иммунитета подсолнечника к заразице // Генетика и Селекция Растений на Дону, Ростов, Изд. Рост. Гос. Унив., 1983. с. 85-90.

28. *Плачек Е.М.* Иммунитет подсолнечника к поражению заразицей (*Orobanche cumana*). // Известия Саратовской С.Х. Саратов, 1921. Том. 3(1-2) с.1-20.

29. *Пустовойт В. С.* Межвидовая гибридизация как метод селекции подсолнечника на групповой иммунитет // Генетика. 1966. Том. 1, с. 59-69.

EVIDENȚA SCHIMBURILOR ÎNTRE CROMATIDELE SURORI LA ORZ (*Hordeum vulgare* L.) ÎN CAZUL INFECȚIEI VIRALE

Andronic Larisa, Jacotă Anatol

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

Introducere

Schimburile între cromatidele surori, SCS (sister chromatid exchange - SCE), au fost pentru prima dată descrise la plante de către Kihlman B. și Kronborg D. [9] prin aplicarea tehnicii de colorare Giemsa [19]. Conform mai multor cercetători, cauza formării SCS, se consideră a fi rupturile bicatenare nereparate la momentul replicării ADN, părere expusă încă de către Wolff S. și coautori [26]. De asemenea, SCS pot fi induse și de abateri în procesul de reparare a acestor rupturi [8; 15]. Se consideră, că geneza SCS este condiționată de momentele de replicare a ADN și anume de formare a furcilor replicative, momente în care poate avea loc recombinarea între cromatidele surori [10]. Conform modelului replicativ de formare a SCS, propus de Painter R.B. [16], replicarea și repararea rupturilor bicatenare, produse la hotarele a două clustere de repliconi, decurg asincron. O asemenea situație poate fi generată de o viteză diferită a procesului de replicare, precum și de modificări structurale în molecula de ADN. Studiul SCS la *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 [7]. 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 imanente și celor induse diferă.

Cu toate că mecanismul formării SCE este încă discutabil [25], cert este stabilit, că geneza acestor schimburi este asociată de leziunile ADN. Grație conservatismului proceselor ce stau la baza formării SCS, testul dat este utilizat pe larg în estimarea genotoxicității [13; 18], fiind aplicat în evaluarea efectului mutagen al diferitor compuși atât la plante [11; 12; 20; 21; 27; 28; 29], cât și la animale [3;8; 22; 32].

Conform cercetărilor realizate de către Zhang Z.L., Yang J. [31], în inducerea SCS la plante (*Vicia faba*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*), limfocitii umani și celulele splinei la șoricea, 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 simplistă și se recomandă a fi utilizată în aprecierea genotoxicității diferitor substanțe.

Conform mai multor relatări fitovirusurile pot induce diverse efecte genetice [2; 4; 5; 14; 30], inclusiv modificarea ratei schimburilor între cromatidele surori [1; 33]. 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 [33]. 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 statistic nu a fost confirmat [1].

Pentru aprofundarea studiului efectului clastogen al infecțiilor virale ne-am propus drept scop evidența ratei și distribuției SCS la orz, în cazul infectării cu virusul mozaicului dungat al orzului comparativ cu razele gama.

Materiale și metode

În cercetare au fost utilizate trei soiuri de orz de primăvară (*Hordeum vulgare* L., 2n=14): Sonor, Unirea și Galactic. Luând în considerație posibilitatea de propagare verticală a virusului mozaicului dungat al orzului în studiu au fost utilizate doar semințe constatate libere de germeni virali. În calitate de martor au servit plantele sănătoase, tratate cu apă distilată și care au prezentat rezultate negative la expertiza virusologică. În corespundere cu obiectivele cercetării semințele de orz au fost iradiate cu raze gama în dozele de 100Gy, 150Gy și 250Gy. Plantele din loturile experimentale, atât cele derivate din semințe sănătoase, cât și din cele iradiate, au fost infectate mecanic cu extract al virusului mozaicului dungat al orzului.

Expertiza virusologică a materialului semincer și a plantelor a fost realizată prin aplicarea tehnicii de contrastare negativă [23].

Pentru studierea inducerii SCS sub acțiunea radiației separat sau în complex cu virusul mozaicului dungat al orzului a fost aplicată metoda analizei frecvenței schimburilor între cromatidele surori în cromozomii mitotici din meristemele radiculare, bazată pe încorporarea diferențiată a 5-brom 2-deoxyuridinei (BrdU) în segmentele cromatidice. În acest scop semințele variantelor cercetate au fost germinate la întuneric până la atingerea lungimii rădăcioarei de 2-3cm. Incorporarea BrdU a fost realizată pe parcursul a două cicluri celulare prin etalare pe discuri expuse în amestec de 100 μM

BrdU, 0.1 μ M FdUrd (fluorodeoxyuridină) și 5 μ M Urd (uridină). Schema de fixare, macerare și colorarea a materialului a fost selectată după [17].

Datele au fost prelucrate statistic, utilizându-se analiza varianței [6]. Contribuția procentuală a sursei de variație a fost calculată în baza testului ANOVA.

Rezultate și discuții

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 virusul mozaicului dungat al orzului, radiațiilor gama (în dozele 100, 150 sau 250 Gy), precum și în cazul infectării plantelor reproduce 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 1). În cazul infecției virale, cel mai major procent de inducere a SCS a fost constatat la soiul *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 100Gy a crescut cu 40.1% și 33.2% față de martor corespunzător la soiurile *Sonor* și *Unirea*, în timp ce frecvența SCS la soiul *Galactic* a crescut doar cu 8.23% ($P \leq 0.05$). Razele gama în doza de 150Gy au indus un efect mai depresiv, decât cel cauzat de doza 100Gy, doar la soiul *Galactic*. La soiul *Unirea* rata SCS per celulă a variat în jur de 7.2, având tendința de micșorare. Potența de modificate a ratei SCS în cazul infecției virale aplicate în complex cu razele gama a variat în dependență genotip și doza razelor gama.

Tabelul 1. Frecvența schimburilor între cromatidele surori induse de virusul mozaicului dungat al orzului în celulele meristemice radiculare la plantele de orz sănătoase și iradiate (per celulă).

Varianta experimentală	Genotipul analizat		
	Sonor	Unirea	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

La soiul *Sonor* derivat din semințe iradiate cu doza 100Gy virusul mozaicului dungat al orzului a generat o creștere mai majoră a SCS față de martor, varianta infectată sau cea iradiată. Rata SCS induse de infecția virală la soiul *Sonor* iradiat cu doza 150Gy 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 soiul Unirea însă pentru varianta „virus+250Gy”. La soiul Galactic virusul mozaicului dungat al orzului, comparativ cu radiația, a condus la creșterea ratei SCS.

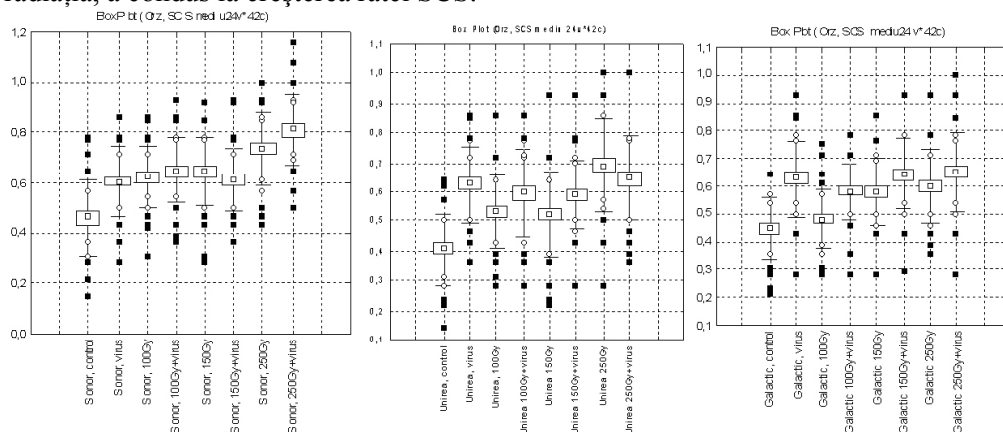


Fig. 1. Valoarea schimburilor între cromatidele surori induse de virusul mozaicului dungat al orzului și razele gama la plantele de *H.vulgare* (per cromozom)

Analiza SCS cu estimarea distribuției schimburilor per cromozom a permis de a evidenția tendința de majorare a dispersiei în cazul variantelor experimentale ($P \leq 0.5$) (figura 1). Luând în considerație spectrul schimburilor între cromatidele surori, a fost constatat, că numărul și tipul SCS sunt influențate de către ambii factorii analizați. Dacă la plantele martor în mediu se produc 0.40-0.46 SCS per cromozom, atunci în unele variante experimentale numărul lor a atins valoarea de 0.69 – 0.73 (la soiurile Galactic și Sonic iradiate cu raze gama în doza de 250Gy).

Studiul distribuției SCS a scos în esență tendința de majorare a ratei cromozomilor cu trei și mai multe schimburi în deosebi la variantele cu utilizare a infecției virale separat sau în complex cu razele gama (figurile 2 și 3).

Majorarea frecvenței medii a SCS în cazul infecției virale, precum și a radiației se produce preponderent pe contul schimburilor multiple, procentul cărora în condiții normale este redus (0.28-0.48 per celulă). În variantele experimentale procentul schimburilor multiple a crescut esențial atingând valoarea maximală la soiul Sonic cu aplicare mixtă a virusului mozaicului dungat al orzului și razelor gama în doza de 250Gy. Pentru varianta dată a fost constatată o creștere a cotei de cromozomi cu schimburi multiple în valoare de 12.7 ori mai mare față de martor.

Aplicarea testului ANOVA a permis de a stabili, că virusul mozaicului dungat al orzului similar razelor gama induce majorarea frecvenței schimburilor între cromatidele surori, prezentând astfel un efect în funcție de genotipul plantei (3.6%), virus (6.1%) și doza radiației (13.4%) (tabelul 2). 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 majoră putere de influență a fost stabilită pentru radiația gama în dependență de doză (13.4%).

Studiile citogenetice realizate de către noi ne permit a constata, că virusul mozaicului dungat al orzului similar razelor gama induc modificări semnificative a numărului SCS. Pentru razele gama, influența cărora asupra ADN este bine cunoscută, este descrisă

capacitatea de inducere a schimburilor între cromatidele surori dependentă de efectul-doză [3], fapt confirmat și în cercetările noastre anterioare. Posibilitatea majorării SCS în condițiile patogenezei virale indică asupra efectului genotoxic cauzat de agentul patogen. În literatură, date privitor genotoxicitatea infecțiilor virale sunt prezentate și pentru unele virusuri animale, cum ar fi virusul hepatitei B sau C [24].

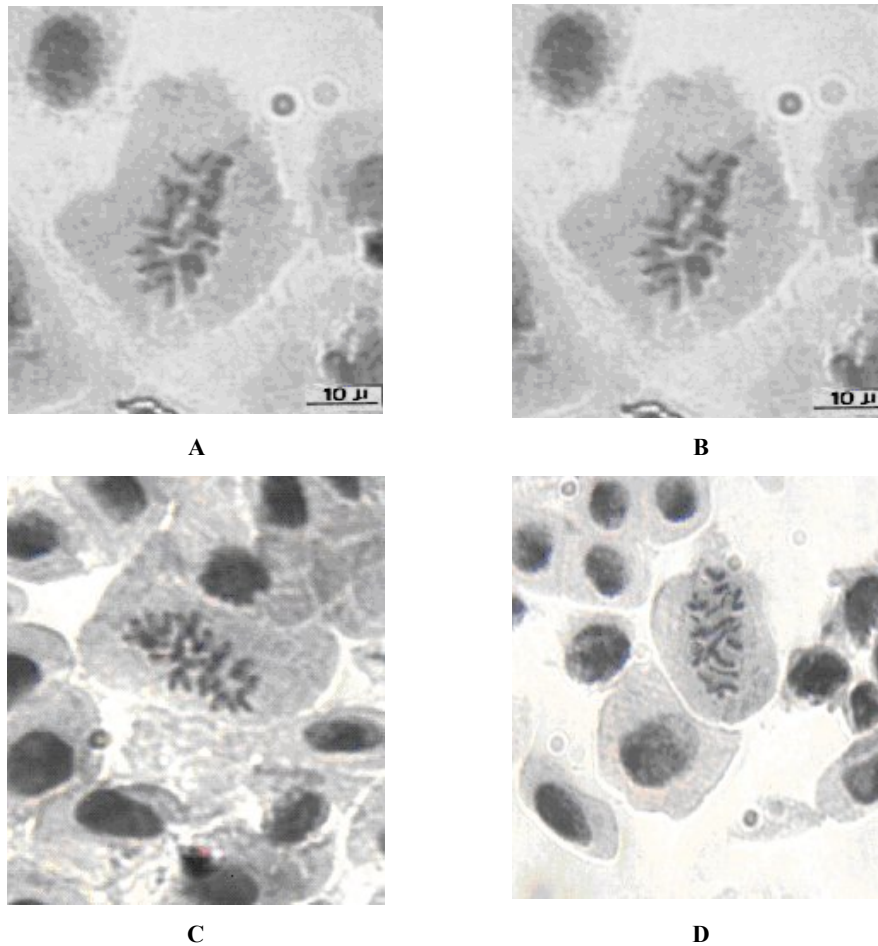


Figura 2. Aspectul unor plăci metafazice în celule meristemice radiculare la *H.vulgare*, soiul Unirea: a) martor, b) virusul dungat al orzului, c) 150 Gy, d) 150Gy+virus.

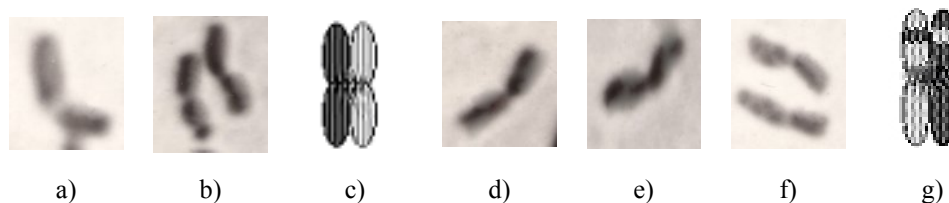


Figura 3. Cromozomi metafazici la *Hordeum vulgare*: a), b) cromozomi fără schimburi cromatidice, c) reprezentare schematică a unui cromozom metafazic fără schimburi cromatidice; d) cromozom cu un schimb cromatidic în brațul lung; e) cromozom cu câte un schimb cromatidic în ambele brațe; f) cromozomi cu multiple schimburi cromatidice; g) reprezentare schematică a unui cromozom metafazic cu un schimb cromatidic.

Tabelul 2. Analiza varianței frecvenței SCS la plantele de orz sănătoase și infectate cu virusul mozaicului dungat al orzului

Sursa variației	Contribuția procentuală a sursei de variație, %	Grad de libertate	Suma pătratelor	S ²	Factorul F	P
A: Virusul	6.06	1	1.37672	1.37672	71.241	0.0000
B: Genotipul	3.65	2	0.829628	0.4148129	21.47	0.0000
C: Doza radiației	13.42	3	3.04913	1.01638	52.50	0.0000
Interacțiunea AB	0.3	2	0.083203	0.0416016	2.38	0.0930
Interacțiunea AC	3.95	3	0.898543	0.299514	17.15	0.0000
Interacțiunea BC	3.01	6	0.684898	0.11415	6.53	0.0000
Interacțiunea ABC	1.35	6	0.3059	0.0509834	2.92	0.0080
Total		913	22.7279			

Concluzia privitor genotoxicitatea virusului mozaicului dungat al orzului derivă din datele privitor creșterea numărului schimburilor între cromatidele surori realizată, în majoritatea cazurilor, pe contul schimburilor multiple.

Bibliografie:

1. *Bujoreanu V., Chiriac Gh.* Plant viruses as possible inducers of genotypic variability in plants. // In: Probleme actuale ale geneticii, biotehnologiei și ameliorării. Chișinău, 1994, p.8-10.
2. *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, p.386-398.
3. *Clewer A.G., Scarisbrick D.H.* Practical statistics and experimental design for plant and crop science. Wiley John, Sons, LTD. Chishester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 2001, 346 p.
4. *Dong Z., Fasullo M.* Multiple recombination pathways for sister chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae*: role of RAD1 and the RAD52 epistasis group genes.// Nucleic Acid Res., 2003. Vol.31, p.2576-2585.
5. *Ishii, Y., Bender, M.* Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells.// Mutat. Res., 1980. Vol. 79, p.19-32.
6. *Kihlman B.A., Kronborg D.* Sister chromatid exchange in *Vicia faba*. I. Demonstration by a modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique.// Chromosoma, 1975, p.1-10.
7. *Kato H.* Mechanisms of sister chromatid exchanges and the relation to production of chromosomal aberrations. // Chromosoma, 1977. Vol. 59, p.179-191.
8. *Khora S.S., Panda K.K., Panda B.B.* Genotoxicity of tetrodotoxin from puffer fish tested in root meristem cells of *Allium cepa* L. // Mutagenesis, 1997. Vol. 12, nr.4, p. 265-269.
9. *Li G., Yun Y., Li H., Sang N.* Effect of landfill leachate on cell cycle, micronucleus, and sister chromatid exchange in *Triticum aestivum*. // *J Hazard Mater.*, 2008. Vol. 155, nr. 1-2, p.10-16.

10. *Maluszynska J., Juchimiuk J.* Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. // *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 2005. Vol.56, p.177-184.
11. *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*). // *Plant Disease*, 1985. Vol. 69, nr. 4, p. 310-312.
12. *Nishi,Y., Hasegawa,M.M., Inui,N., Ikegami,S. and Yamada,M.-A.* Effect of post-treatment with aphidicolin – a specific inhibitor of DNA polymerase α – on sister-chromatid exchanges induced by ethyl methanesulfonate. // *Mutat. Res.*, 1982. Vol.103, p. 155–159.
13. *Painter R. B.* A replication model for sister-chromatid exchange. // *Mutat. Res.*, 1980. Vol. 70, p.337-341.
14. *Panda K.K., Patra J., Panda B.B.* Induction of sister chromatid exchanges by heavy metals salts in root meristem cells of *Allium cepa*.// *Biol.Plantarum*, 1996. Vol. 38, p.555-561.
15. *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*. // *Marine Ecology progress series*, 1996. Vol.143, p.113-119.
16. *Perry P., Wolff S.* New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. // *Nature*, 1974. Vol. 251, p.156-158.
17. *Qian Xiao-wei.* Mutagenic effects of chromium trioxide on root tip cells of *Vicia faba*. // *Journal of Zhejiang University Science*, 2004, Vol.5, nr.12, p.1570-1576.
18. *Sang N, Li G.* Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. // *Mutat Res.* 2004. Vol. 560, nr. 2, p.159-165.
19. *Sonoda E., Sasaki M.S., Morrison C., Yamaguchi-Iwai Z., Takata M., and Takeda S.* Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells.// *Molecular and Cellular Biology*, 1999. Vol. 19, nr. 7, p. 5166-5169.
20. *Tander B.* Improved uranyl acetate staining for electron microscopy. // *J. Electron. Microsc. Techn.* 1990. Vol.16, p.81-82.
21. *Ucur A., Palanduz S., Cefle K., Ozturk S., Tutkan G., Vatansever S., Erden S., Karan MA., Erten N., Guler K., Tascioglu C.* Sister chromatid exchange and mitotic index in patients with cirrhosis related to hepatitis B and C viruses and in chronic carriers. // *Hepatogastroenterology*, 2003. Vol. 50, nr. 54, p. 2137-2140.
22. *Wilson D.M., Thompson L.* Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. // *Mutation Research*, 2007. Vol. 616, nr.1-2, p.11-23.
23. *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. // *Mutat. Res.*, 1974. Vol. 25, p.73–81.
24. *Xing W.* Effects of dNTPs on the SCE frequency in plant root tip cells.// *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1997. Vol. 379, nr.2, p.117-119.
25. *Yi H., Lui J., Zheng K.* Effect of sulfur dioxide hydrates on cell cycle, sister chromatid exchange, and micronuclei in barley. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005. Vol. 62, p.421-426.
26. *Yi H., Si L.* *Vicia* root-micronucleus and sister chromatid exchange assays on the genotoxicity of selenium compounds.// *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2007. Vol.630, nr.1-2, p.92-96.
27. *Yukhimenco A.I., Voloshchuk S.I., Girko V.S.* Winter wheat viruses as a biological stress factors inducing genetic variation.// *Abstr. 11th Congress of the FESPP, Varna, 1998.*

28. Zhang Z., Yang J. Effects of amino acids on sister-chromatid exchanges. // Mut. Res., 1992. Vol. 280, nr. 4, p.279-283.

29. Кудряшова О.В., Жлоба А.А. Закономерности образования сестринских хроматидных обменов (СХО) в трех генерациях после облучения. // Цитология, 2000. Том.42, nr.4, стр. 392-398.

30. Немчинов Л.Г. Генетическая изменчивость кукурузы в условиях вирусного патогенеза. // Автореф. дис. к.б.н., Минск, 1990, 20 с.

POTENȚIALUL GENETIC DE REZISTENȚĂ LA ARȘIȚĂ AL SOIURILOR ȘI LINIILOR VALOROASE DE TOMATE

Mihnea N., Grati M., Macovei M., Jacotă A.

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

Introducere

Republica Moldova, precum și multe țări ale lumii, în ultimele decenii se confruntă cu dezechilibrări ecologice tot mai frecvente, care duc la diminuări considerabile ale productivității și calității producției agricole. În legătură cu aceasta s-au intensificat lucrările de ameliorare în domeniul rezistenței plantelor la factorii nefavorabili biotici și abiotici [2, 5, 6, 7, 8, 9]

Crearea și implementarea în agricultură a soiurilor înalt productive cu calități gustative înalte și adaptate la condițiile climatice ale Moldovei rămâne a fi o direcție prioritară în cercetările de ameliorare a tomatelor.

Scopul cercetărilor a fost studiul rezistenței la arșiță și potențialului de productivitate a soiurilor și liniilor de tomate create în Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM.

Materiale și metode.

În calitate de obiect de studiu au servit soiuri și linii de tomate create prin încrucișări inter- și intraspecifice. Formele perspective de tomate au fost testate după rezistența la arșiță a sporofitului și gametofitului masculin. Totodată, analiza variabilității caracterului de rezistență a sporofitului a fost efectuată în baza lungimii rădăcinii embrionare, iar a gametofitului masculin în baza lungimii tubului polenic. Au fost testați următorii parametri: viabilitatea polenului în condiții optime și de stres, lungimea rădăcinii embrionare și a tubului polenic în condiții optime și de stres și schimbarea lungimii rădăcinilor și tubului polenic în rezultatul acțiunii temperaturilor ridicate.

Pentru analiza influenței temperaturilor ridicate asupra rădăcinilor embrionare și tubului polenic au fost utilizate următoarele regimuri: A-35/ B-38/ C-43^o C pentru sporofit, cu durata expoziției de 6 ore, iar pentru gametofitul masculin A-38/ B-45/ C-48^o C, cu durata expunerii de 3/5/7 ore, respectiv. În așa mod s-a creat un fond diferențiat pentru selectarea formelor rezistente la temperaturi ridicate atât la nivelul gametofitului cât și a sporofitului.

Viabilitatea polenului a fost determinată prin cultivarea pe mediu nutritiv artificial conform metodei Golubinschii [1].

Pentru aprecierea genotipurilor de tomate după rezistența sporofitului la temperaturi