SECȚIUNEA IV

ASPECTE GENETICE ȘI FIZIOLOGICE DE CREARE A PLANTELOR DE CULTURĂ CU POTENȚIAL SPORIT DE REZISTENȚĂ LA BOLI ȘI DĂUNĂTORI

IMPACTUL DESTABILIZATOR AL INFECȚIILOR VIRALE ASUPRA MICROSPOROGENEZEI LA PLANTELE GAZDĂ

Andronic Larisa

Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău, str. Pădurii 20, MD 2002, e-mail: andronic.larisa@yahoo.com

Abstract. The pathogenicity reactions described in the sensitive genotypes of tomatoes and barley include specifically changes in the processes of meiotic division, with repercussions in the offspring of infected plants. The percentage of aberrant pollen mother cells (PMCs) in the offspring is at the level of control plants, while the percentage of aberrations per PMC and the frequency of meiotic conjugation are significantly higher. The consequences in meiotic division in virus free progenies reflect the destabilizing transgenerational effect of viral infection on microsporogenesis processes.

Key words: plant viruses, microsporogenesis, meiotic recombination, susceptibility

Introducere

Cunoașterea modului în care plantele interacționează cu virusurile, realizând procesele vitale proprii ale gazdei, dar și cele de reproducere și distribuire a componentelor virali, permite dezvăluirea constituenților procesului de patogeneză. Unele dintre elementele cheie ale asigurării dezvoltării plantelor au la bază proliferările celulare, fenomene aflate sub control genetic. Celulele în reproducere reprezintă unități morfofuncționale ce reacționează rapid și activ la factorii endo- și exogeni [9], iar conservatismul proceselor proliferative asigură posibilitatea utilizării diferiților parametri ai diviziunilor celulare în studiile de monitoring și ale reactivității plantelor față de diferiți factori.

Conform unor autori [5; 7] sunt raportate modificări ale diviziunilor celulare în condiții de infecție virală, fiind demonstrate perturbări complementare ale proceselor transcripționale, rearanjamente ale cromatinei, incluzând metilarea ADN și creșterea frecvenței recombinării. Astfel, la urmașii plantelor infectate cu virusul mozaicului tutunului a fost atestată creșterea ratei de recombinare omoloagă, sporirea restructurărilor ADN-ului și hipometilarea repetărilor bogate în leucine, locilor omologi cu gena N (gena rezistenței la VMT) [2]. Se postulează, că 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 anterioare au fost demonstrate efectele destabilizatoare ale diviziunilor meiotice la plantele de orz și tomate infectate cu virusuri, ce includ modificări ale procesului de microsporogeneză ce implică recombinarea meiotică și distribuția materialului genetic între celulele fiice, repercusiuni stabilite cu diferită amplitudine și la urmași. În lucrarea de față ne-am propus realizarea studiului comparativ al impactului provocat de diferite virusuri la tomate și orzul de primăvară la gazdele susceptibile, precum și la descendenții liberi de germeni virali.

Materiale și metode

Cercetările au fost realizate pe plante de tomate și orz de primăvară infectate mecanic cu extract vegetal proaspăt obținut din plante infectate natural cu agenți virali, identificați prin metode de diagnostic (metoda contrastării negative, metoda imunosorbentă).

Plantele de tomate (s. Fachel, s. Nistru, s. Prizior, s. Elvira, *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum*) au fost infectate în faza de 3-4 frunzulițe cu virusurile aspermiei tomatelor (VAT), X al cartofului (VXC) și cele de orz (s. Galactic, s. Sonor, s. Unirea) – cu virusul mozaicului dungat al orzului (VMDO) la etapa de 2-3 frunze. 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. Fructele ciorchinelor II și III, precum și spicele formate în condiții de patogeneză virală, au servit pentru obținerea și evaluarea descendenților.

Pentru examinarea meiozei au fost utilizate anterele din mugurii floralii aflați în faza meiotică (pentru tomate faza de butonizare), sau spiculețe de orz (faza de burduf) după fixare în amestecul alcool etilic: acid acetic glacial (3:1). Frotiurile celulare au fost colorate prin tehnica regresivă cu carmină acetică. Preparatele temporare au fost utilizate în studiul numărului și tipului bivalentilor la o celulă mamă polinică (CMP), parametri utilizați în evaluarea recombinării meiotice; precum și cotei aberațiilor meiotice în Anafaza-Telofaza I și II.

Rezultate și discuții

Răspunsul plantelor la infecțiile virale include diverse niveluri de complexitate [3]. 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.

Evaluarea microsporogenezei la plantele de tomate infectate cu VAT, VXC și de orz infectate cu VMDO a scos în evidență abateri în conjugarea cromozomilor omologi, exprimate prin redistribuirea schimburilor cromatidice, inducerea de noi coeziuni sinaptice, în special în regiunile interstițiale.

Conform rezultatelor obținute, genotipurile analizate de tomate au reacționat la infectarea cu VAT, VXC prin modificarea numărului de chiasme la o CMP. Testul Anova a scos în evidență variația chiasmelor interstițiale per CMP în dependență de infecția virală în proporție de 33,26%, genotipul deținând o putere de influență în proporție de 5,14%.

Ca urmare a infectării tomatelor la descendenți se constată schimbarea coraportul dintre numărul de chiasme terminale și interstițiale la o CMP. Desfășurarea evenimentelor meiotice în condiții de patogeneză a condiționat majorarea frecvenței bivalentilor 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 bivalentilor de tipul "TT" și "T+II", ceea ce în final a condus doar la modificarea sumei totale a chiasmelor după poziția deținută (interstițială sau terminală) (Fig. 1). Asemenea redistribuire are o mare semnificație, deoarece favorizează majorarea recombinării genelor localizate în aceleași grupuri de *linkage*.

Fig. 1. Distribuția tipurilor de bivalenți la descendenții plantelor martor (A) și infectate cu VAT (B).

În meiocitele de orz mai frecvent erau vizualizați bivalenți asociați la un capăt telomeric, precum și conjugați prin două chiasme – una telomerică și una interstițială. La cele trei soiuri analizate infecția virală a condiționat modificări statistic apreciable. VMDO a generat modificări ale recombinării meiotice și la descendenți. 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 (Fig. 2). Asemenea modificări în distribuția chiasmelor denotă elocvent nu doar redistribuirea coeziunilor dintre cromatidele surori, dar și inducerea de schimburi noi.

Fig. 2. Dendrograma repartiției bivalenților conform distribuției chiasmelor în diachineză la plantele de orz sănătoase (A) și la descendenții plantelor infectate (B).

Analiza citologică la etapele ulterioare ale diviziunilor meiotice a evidențiat majorarea frecvenței aberațiilor meiotice la soiurile de tomate în cazul infectării cu VAT, VXC, precum și la soiurile de orz de primăvară infectate cu VMDO. Spectrul modificărilor citogenetice produse de virusurile VAT, VXC la genotipurile gazdă de tomate a fost similar celui cauzat de VMDO la orzul de primăvară (Tabel).

Tabel. 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.pimpinellifolium</i> var. <i>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 CPM cu aberații	+	+	-	+	-
	Sporade anormale	+	+	-	+	-
Progresiunea microsporo-genezei	Sporirea asincronismului	+	+	-	+	-
	Sporirea eterogenității	+	+	-	+	-
	Accelerarea diviziunilor meiotice	+	+	-	+	-

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 cazul acțiunii radiației gama, precum și celor descrise în literatură în cazul androsterilității.

Ca rezultat al infectării cu virusuri a plantele de tomate și orz de primăvară are loc sporirea tetradelor anormale: creșterea esențială a cotei 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.

Efectele destabilizatoare ale meiozei provocate de infecțiile virale au generat abateri în sincronizarea etapelor diviziunilor celulare. Este cunoscut, că progresia microsporo-genezei este sub control genetic, evenimentele desfășurate fiind condiționate de procese stabilite de la primele etape. Factorii externi de stres pot favoriza evaluarea sau inhibarea derulării fazelor meiozei. În desfășurarea evenimentelor microsporo-genezei se atestă diferențe la diferite etape,

iar acestea pot fi apreciate și cuantificate. 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 (specific pentru orz), cât și pentru cele cu tip simultan (tipic pentru tomate). 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 [6] sau la gameți cu număr de cromozomi neechilibrat [1; 4], în general, fiind considerat ca o anomalie meiotică [9].

Realizările conceptuale și metodologice ale virusologiei contemporane denotă clar, că virusurile pantelor sunt elemente esențiale ale ecosistemelor prin stabilirea relațiilor mutualiste în asigurarea funcționalității și adaptabilității ecosistemelor la schimbările de mediu, reprezentând un factor cheie al selecției [8].

Concluzii

Analiza citologică a procesului de microsporogeneză a evidențiat majorarea frecvenței aberațiilor meiotice și recombinării meiotice la genotipurile de tomate în cazul infectării cu VAT, VXC, precum și la soiurilor de orz infectate cu VMDO. Sistemele gazdă-patogen reacționează specific reacției genotipului analizat în ce privește frecvența *crossing-over*-ului meiotic și cota aberațiilor.

Procentul CMP aberante la descendenții plantelor infectate este la nivelul plantelor mator, în timp ce cota aberațiilor per CMP și frecvența conjugării meiotice sunt relevant mai majore. Repercusiunile diviziunilor celulare stabilite la urmașii liberi de germenii virali reflectă efectul transgenerațional destabilizator al infecției virale asupra proceselor de microsporogeneză.

Bibliografie

1. BIELING, L.M., MARIANI, A., BERDING, N. Cytological studies of 2n male gamete formation in sugarcane, *Saccharum* L. In: *Euphytica*. 2003, vol. 133, p. 127–134.
2. 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, p. 1714–1725.
3. GARCIA-RUIZ, H. When viruses infect plants. In: *Scientia*. 2019, vol. 123, p. 40–43.
4. 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, p. 101–108.
5. 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, p. 1859–1870.
6. 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, p. 9–14.
7. KOVALCHUK, I., KOVALCHUK, O., KALCK, V. Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. *Nature* (Lond.). 2003, vol. 423, p. 760–762.
8. LEFEUVRE, P., MARTIN, D. P., ELENA, S. E., et al. Evolution and ecology of plant viruses. In: **Nature Reviews Microbiology**, 2019, vol. 17, p. 632–644.
9. YANG, J., KANG, X. Microsporogenesis and flower development in *Eucalyptus urophylla* × *E. tereticornis*. In: *Breed Sci.* 2015, vol. 65, p. 138–144.