

## STUDIUL VARIABILITĂȚII SOMACLONALE INDUSE DE VIRUSUL MOZAICULUI CONOPIDEI LA PLANTELE GAZDĂ

Larisa ANDRONIC

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

The objective of this work was to study the influence of the cauliflower mosaic virus on the somaclonal variation in cabbage. For five healthy and virus infected genotypes was establish that, the frequency of calusogenesis and regeneration changes in proportion of 50% depending on plant genotype. The virus infection represents a source of variance of calusogenesis and recombinogenesis with a power in 36% and 18% respectively. In our experiments which were conducted using one and the same genotype, the analysis of variance revealed the highest effect of the explant nature (70%). Observed differences among healthy and virus infected genotypes will undoubtedly affect the somaclonal variation, that is very important, especially from the standpoint of using phytopathogenic viruses as inducers of genetic variability.

### Introducere

Variabilitatea somaclonală apare ca rezultat al cultivării celulelor sau țesuturilor pe medii de cultură în condiții *in vitro* [1]. Factorii de bază ce induc variabilitatea somaclonală sunt de natură genetică și epigenetică, precum și condițiile, durata cultivării explantului [2-4]. Orice inductor genetic (aneuploidie, poliploidie, re-aranjamente structurale ale ADN) poate genera variante somaclonale apte de a se transmite ereditar [5,2]. Natura genetică a variantelor derivate *in vitro* a fost confirmată printr-un șir de cercetări genetice și moleculare. Prin aplicarea tehnicii RAPD a fost relevat polimorfismul genetic la somaclonele de persic [6], tomate [7], vindecea [8], soia [9].

Variabilitatea somaclonală poate atinge cele mai diverse însușiri ale plantei, unele dintre care pot prezenta interes practic (productivitate, rezistență sau toleranță față de factori biotici sau abiotici ai mediului), reprezentând astfel o sursă importantă de forme cu noi caractere. Astfel, prin aplicarea culturii *in vitro* au fost obținute forme de grâu și sorg cu productivitate sporită [10-12], conținut ridicat de proteine [13] și ulei [14], precocitate și rezistență sporită la patogeni [11].

Este important a menționa că nu toate modificările somaclonale se expresează fenotipic. Totodată, o parte din ele este eradicată la diferite etape morfogenetice. În scopul majorării variabilității somaclonale, în condiții experimentale, pe larg se aplică îmbinarea tehnicii de culturi *in vitro* cu aplicarea diferiților factori fizici sau chimici. Conform datelor obținute în urma unui șir de cercetări, fitovirusurile, de asemenea, pot induce majorarea variabilității genetice [15,16].

Din cercetările anterioare este cunoscut că virusul mozaicului conopidei induce la plantele gazdă un spectru variat de modificări, inclusiv malformații, terate, rareori tumori nervuriene sau radiculare. Un interes deosebit prezintă studierea variabilității somaclonale induse de virusul mozaicului conopidei la plantele gazdă din diferite sisteme citopatice, cu evidențierea particularităților specifice tipului explantului (tumori, terate, țesut învecinat malformațiilor).

În lucrarea de față ne-am propus drept scop studierea variabilității somaclonale induse de virusul mozaicului conopidei la plantele gazdă, cu evidențierea particularităților specifice explantului, genotipului gazdei și mediului de cultură.

### Material și metode

Drept material biologic au servit cinci soiuri de varză albă (*Brassica oleracea var. capitata*: Amager (tardiv), Harkovskaia (tardiv), Iuniscaia (timpuriu), Slava (mijlociu) și Podaroc (tardiv) și un soi de conopidă (*Brassica oleracea var. botrytis*), care s-au dovedit a fi sensibile față de virusul mozaicului conopidei (CaMV – virus ADN dublu spiralat, reprezentant al genului Caulimovirus). Virusul CaMV a fost izolat din *Datura stramonium* și identificat prin analiza ELISA (trusa de diagnostic SANOFI DIAGNOSTICS Pasteur). În faza de 2 frunze dicotilidonate plantele variantei experimentale au fost infectate cu virusul mozaicului conopidei. Pentru diagnosticul plantelor bolnave, precum și al celor libere de infecție s-au folosit diferite procedee ale microscopiei electronice (contrastare negativă, imunosorbentă), precum și testul ELISA.

Astfel, din plante testate purtătoare de germeni virali (prin metoda imunomicroscopică [17] și imunoenzimatică [18]) au fost selectate explante de pețiol, frunză de aproximativ 1 mm<sup>3</sup> din zone histologice similare

purtătoare de simptome unimorfe (sector clarifiat, enație, sector hiperchromatizat), care au fost în continuare sterilizate și plantate în eprubete. Inițial au fost experimentate opt variante de adaosuri de vitamine și hormoni la mediul Murashige, Skoog [19]. Mai optim pentru calusogeneza materialului infectat 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%). Explantele au fost incubate la întuneric la temperatura de 25°C pentru inițierea calusurilor, apoi transferate în încăperi cu un fotoperiodism de 16 ore, temperatură 27°C și iluminare de 2000 lx. Evidențierea calusogenezei a fost efectuată pe parcursul a patru luni.

Frecvența calusogenezei și regenerării a fost studiată în baza următorilor indici: total explante, explante cu răspuns de calusare, explante cu răspuns morfogenetic.

Datele au fost prelucrate statistic, utilizându-se analiza varianței [20].

### Rezultate și discuții

Analiza capacității calusogenezei la genotipurile analizate a permis de a constata că infecția virală contribuie la reducerea frecvenței calusogenezei în medie cu 41% față de martor (Tab.1). Cea mai puternică influență represivă a infecției virale a fost stabilită pentru soiul Podaroc (frecvența calusogenezei a fost micșorată cu 80%,  $P < 0,001$ ). Un impact mai lejer, dar statistic confirmat, a fost remarcat pentru soiul Harkovscaia (frecvența calusogenezei a fost micșorată cu 18%,  $P < 0,05$ ). De menționat că doar pentru acest soi a fost estimată reducerea semnificativă a frecvenței regenerării (frecvența regenerării a fost micșorată cu 55%,  $P < 0,01$ ). Pentru soiul Podaroc a fost constatată o tendință de creștere a capacității regenerative a explantelor derivate de la plante virus infectate comparativ cu martorul, care însă nu a fost confirmată statistic.

**Tabelul 1**

#### Frecvența calusogenezei și regenerării *in vitro* la unele soiuri de varză infectate cu virusul mozaicului conopidei

Genotipul analizat	Varianta experimentală	Frecvența calusogenezei	Frecvența regenerării
Harkovscaia	Martor	56,55±6,27	64,17±5,20
	CaMV	46,51±3,57*	28,97±4,18**
Moldavscaia	Martor	45,21±4,46	65,48±13,52
	CaMV	29,72±3,19**	55,56±9,62
Iuniscaia	Martor	91,03±4,07	53,26±9,19
	CaMV	70,38±2,18***	25,18±17,59
Slava	Martor	84,73±5,17	35,18±13,17
	CaMV	54,69±9,28**	36,67±20,21
Podaroc	Martor	78,26±5,68	23,74±7,26
	CaMV	15,28±6,05***	33,33±6,23
Conopida	Martor	49,47±6,37	44,44±13,88
	CaMV	22,01±1,91***	35,00±8,88

\*, \*\*, \*\*\* – diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,05$ ; 0,01; 0,001

Aplicarea testului ANOVA a permis de a evalua contribuția procentuală a genotipului gazdei și a infecției virale asupra capacității de calusogenază sau regenerare (Tab.2).

**Tabelul 2**

#### Analiza varianței pentru capacitatea de calusogenază și regenerare la unele soiuri de varză

Sursa variației	Contribuția procentuală a sursei de variație (%)	Gradul de libertate	Suma pătratelor	S <sup>2</sup>	Factorul F	P
Varianța frecvenței calusogenezei						
Virus	35,91	1	2314,3	2314,3	13,14	0,0151
Genotip	50,42	5	3249,13	649,825	3,69	0,0891
Rezidual		5	880,617	176,123		
În total		11	6444,04			

Variația frecvenței regenerării						
Virus	18,21	1	426,815	426,815	2,93	0,1475
Genotip	50,73	5	1188,82	237,765	1,63	0,3017
Rezidual		5	727,955	1445,571		
În total		11	2343,49			

Cercetările efectuate au pus în evidență influența prioritară a genotipului gazdei. 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%, ceea ce constituie variația frecvenței regenerării indusă de virusul mozaicului conopidei. Variația calusogenezei și a regenerării în dependență de genotip este practic la același nivel, variind în jurul valorii 50.

Din literatura de specialitate este bine cunoscut caracterul eterogen al reorganizărilor structurale induse de virusuri la nivel celular, tisular. În acest context, un interes deosebit prezintă studierea calusogenei pentru diferite zone morfopatologice.

Analiza diversității somaclonale în diferite situații citopatice a stabilit un grad deosebit de proliferare celulară în condiții *in vitro*. Astfel, evidența capacității calusogenezei la trei genotipuri de *Brassicaceae* (*Br. oleracea* var. *botrytis* și două soiuri de *Br. oleracea* var. *capitata*: Harkovscaia și Podaroc) la infectarea cu virusul mozaicului conopidei a permis de a constata reducerea frecvenței calusogenezei în țesuturile macrostructural nemodificate ale genotipurilor infectate de la 17 până la 55%. Cel mai redus nivel al calusogenezei a fost stabilit pentru zonele învecinate malformațiilor, calusogeneza fiind redusă cu 45-70% comparativ cu martorul sănătos (Tab.3). 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 decât la martor (cu 73%).

Tabelul 3

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

Genotipul		<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> (soiul Harkovscaia)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> (soiul Podaroc)
Varianta experimentală				
Martor	țesut nemodificat	55,6±6,6	62,5±5,7	46,3±7,7
CaMV	țesut nemodificat	25,3±3,7***	51,7±8,3*	30,1±1,9*
	țesut malformat	51,4±9,1	71,4±6,8	80,0±6,2***
	țesut învecinat malformațiilor	16,7±4,1***	27,3±5,2***	25,4±3,2***

\*, \*\*, \*\*\* – diferențe semnificative pentru  $P \leq 0,05; 0,01; 0,001$

Datele privitor la aportul fiecărui din acești trei factori: genotip-virus-explant asupra capacității de calusogeneză remarcă deținerea unui control dominant din partea explantului (Tab.4). Celelalte două componente au o putere de influență practic similară.

Tabelul 4

**Analiza varianței pentru capacitatea de calusogeneză la unele soiuri de varză în dependență de zona citopatică**

Sursa variației	Contribuția procentuală a sursei de variație	Suma pătratelor	GL	Pătratul mediu	F	P
Genotipul	10,98	0,0489542	2	0,0244771	2,97	0,1269
Virusul	10,98	0,0489607	1	0,0489607	5,97	0,0506
Explantul	70,73	0,315302	2	0,157651	19,13	0,0025

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 al 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). Este cunoscut faptul că doar pătrunderea particulelor virale prezintă semnale ce induc reacții de răspuns care au la bază un șir de reacții biochimice. Modificările stabilite în cazul infecțiilor proliferative cuprind cele mai diverse procese fiziologice și biochimice [21]. Efectele genetice provocate de fitovirusuri nu mai sunt surprinzătoare. Într-un șir de lucrări citate în [16] sunt descrise modificări ale procesului de conjugare a cromozomilor, ale repartiției materialului genetic între celulele fiice, modificări ale crossing-overului în anumite segmente marcate, fiind prezentată însușirea infecției virale drept inductor al variabilității genetice. Prin aplicarea analizei dispersionale în studiul dat a fost confirmat impactul infecției virale asupra variabilității somaclonale; puterea de influență a agentului patogen fiind specifică genotipului. S-a stabilit că în cadrul aceluiași genotip originea explantului constituie sursa esențială de variație a capacității de calusogeneză, determinând cca 70% din variațiile acestui indice.

### Concluzii

- ✓ Frecvența calusogenezei și regenerării la cele 5 genotipuri de varză studiate este determinată de genotip în proporție de 50%. Virusul mozaicului conopidei contribuie la variația calusogenezei și regenerării cu o putere de influență de cca 36 și 18%, respectiv.
- ✓ Originea somaclonei reprezintă o sursă majoră ce determină variația calusogenezei cu o contribuție de cca 70%.
- ✓ Rezultatele experimentale, confirmate în baza analizei dispersionale, ne permit de a scoate în evidență impactul infecției virale asupra proliferării celulare în condiții *in vitro* modulată de originea explantului și genotipul gazdei.

### Referințe:

1. Larkin P., Scowcroft W.R. Somaclonal variation- a novel source of variability from cell culture for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.* - 1981. - Vol.60. - P.197-214.
2. 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 // *Cell. Mol. Biol.* - 2002. - No.7. - P.1111-1120.
3. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. 3-е изд. - Москва. Академкнига, 2003. - 431с.
4. Кузнецова О.И., Аш О.А., Гостимский С.А. Изучение продолжительности культивирования каллусов на накопление генетических изменений у регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) // *Генетика.* - 2006. - Том 42. - №5. - С.684-692.
5. Mohmand A.S., Nabors M.W. Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes // *Plant Cell. Rep.* - 1990. - No. 8. - P.558-560.
6. Hashmi G., Huettel R., Meyer R. et al. RATD analysis of somaclonal variants derived from callus cultures of peach // *Plant Cell. Rep.* - 1997. - Vol.16. - P.624-627.
7. Soniya E.V., Banerjee N.S., Das M.R. Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato // *Current. Sci.* - 2001. - Vol.80. - P.1231-1215.
8. Хусейн И.А., Хадеева Н.В., Кочиева Е.З. Использование биохимических и молекулярных маркеров для выявления полиморфизма генома овощного стахиса (*stachys*) при микроклональном размножении // *Сельскохозяйственная биотехнология. Сб. ТСХА.* - 2001.- Т.2. - С.54-60.
9. 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 // *Plant Breeding.* - 2002. - Vol.121. - P.269-271.
10. Maralappanavar M.S., Kuruvinashetti M.S., Harti C.C. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. // *Euphytica.* - 2000. - Vol.115. - P.173-180.
11. Arun B., Joshi A.K., Chand R., Singh B.D. Wheat somaclonal variations earliness, improved spot blotch resistance and higher yield // *Euphytica.* - 2003. - P.235-241.
12. Баер Г.Я., Емец А.И., Стадничук Н.А., Рахметов Д.Б., Блюм Я.Б. Соматическая вариабильность как источник для создания новых сортов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. // *Цитология и генетика.* - 2007. - №4. - С.9-14.
13. Ryan S.A., Larkin P.J., Ellison F.W. Somaclonal variation in some agronomic and quality characters in wheat // *Theor. Appl. Genet.* - 1987. - Vol.74. - P.77-82.

14. Patnaik J., Sahoo S., Debata B.K. Somaclonal variation in cell suspension culture-derived regenerants of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* // Plant Breed. - 1999. - Vol.118. - P.351-354.
15. Andronic L. The tomato aspermy virus as an inducer of genetic variability in infected plants // Conf. *Ecologia Europaea'97*. - Strasbourg (France), 1998, P.1-2.
16. Chiriac Gh., Andronic L., Bujoreanu V., Marii L. Feature of crossing-over in virus-infected tomato // Central European Journal of Biology. - 2006. - Vol.3. - No3. - P.386-398.
17. Derrick K.S. and Brlansky R.H. Assay for viruses and mycoplasmas using serologically specific electron microscopy // *Phytopathology*. - 1976. - Vol.66. - P. 816-820.
18. Clark M.F. and Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent detection of plant viruses // *J. Gen. Virol.* - 1977. - Vol.34. - P.475-483.
19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* - 1962. - Vol.15. - P.473-497.
20. Clewer A.G., Scarisbrick D.H. Practical statistics and experimental design for plant and crop science. - J.Wiley & Sons LTD, Chichester, UK, 2001. - 346 p.
21. Callow J.A. Biochemical Plant Pathology. - John Wiley & Sons, 1983. - 484 p.

*Prezentat la 20.02.2008*