



UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE



**STUDIUL FILOGENETIC ȘI FILOGEOGRAFIC AL SPECIEI
PHASEOLUS VULGARIS L. DIN COLECȚIA BĂNCII DE RESURSE
GENETICE VEGETALE „MIHAI CRISTEA” SUCEAVA**

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Coordonator de doctorat:

Prof. univ. dr. habil. GORGAN DRAGOȘ-LUCIAN

Student-doctorand:

GRECULEAC PAULA-MARIA

IAȘI
2024

CUPRINS

CUPRINS.....	2
LISTA PRESCURTĂRILOR	5
INTRODUCERE.....	6
MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI.....	8
CAPITOLUL 1	11
1. STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	11
1.1. <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L. - ASPECTE GENERALE ȘI CLASIFICAREA SISTEMATICĂ ...	11
1.2. IMPORTANȚA SPECIEI <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L.....	12
1.3. RĂSPÂNDIRE ȘI CULTIVARE	12
1.4. FILOGEOGRAFIA	13
1.5. FILOGENIE ȘI DIVERSITATE GENETICĂ.....	14
1.6. STRESUL HIDRIC	14
1.6.1. Mecanismele de răspuns ale organismelor vegetale supuse stresului hidric și efectele produse.....	15
1.6.2.Efectele produse de stresul hidric în plante - modificări morfologice.....	15
1.6.3.Efectele produse de stresul hidric în plante - modificări fiziologice și biochimice.....	16
1.6.3.1. Fotosinteza	16
1.6.3.2. Reglarea osmotică	16
1.6.3.3. Proteine sintetizate în perioadele de secetă	16
1.6.3.4. Producția speciilor reactive de oxigen (ROS) și sistemele de eliminare ale acestora în timpul perioadelor de secetă	17
1.6.3.5. Fitohormonii cu implicații în stresul hidric	17
1.6.4. Efectele produse de stresul hidric în plante – modificări la nivel molecular.....	17
CAPITOLUL 2	19
2. MATERIALE ȘI METODE	19
2.1. MATERIALUL BIOLOGIC	19
2.2. METODELE DE LUCRU	19
2.2.1. Analiza morfologică a semințelor de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	19
2.2.2. Germinația probelor de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	20
2.2.3. Izolarea și purificarea ADN	20
2.2.4. Cuantificarea acizilor nucleici	20
2.2.5. Amplificarea unor regiuni codificatoare și spații intergenice pentru studiul filogeniei și filogeografiei variantelor de interes.....	20
2.2.6. Electroforeza ADN în gel de agaroză.....	21
2.2.7. Purificarea produșilor PCR	21
2.2.8. Secvențierea SANGER.....	21
2.2.9. Designul experimental	21
2.2.10. Evaluarea morfologică a plantelor de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	22

2.2.11. Analiza morfoanatomică a indivizilor speciei <i>Phaseolus vulgaris</i> L. din loturile martor și loturile neirigate.....	22
2.2.12. Cuantificarea unor compuși biochimici	22
2.2.13. Determinarea unor parametri fiziologici	23
2.2.14. Izolarea și purificarea ARN.....	23
2.2.15. Real Time Quantitative PCR (RT-qPCR).....	23
CAPITOLUL 3	24
3. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	24
3.1. EVALUAREA PROCESULUI GERMINATIV	24
3.2. EVALUAREA CANTITATIVĂ ȘI CALITATIVĂ A ADN.....	24
3.2.1. Cuantificarea spectrofotometrică a ADN – evaluare cantitativă și calitativă.....	24
3.2.2. Evaluarea calitativă a ADN prin electroforeză în gel de agaroză	25
3.3. AMPLIFICAREA PCR A SECVENȚELOR DE INTERES ȘI VALIDAREA AMPLICONILOR PRIN ELECTROFOREZĂ.....	25
3.4. ANALIZA SECVENȚELOR GENEI <i>PvDREB5A</i>	26
3.5. ANALIZA SECVENȚELOR GENEI <i>PvDREB6B</i>	28
3.6. ANALIZA SECVENȚELOR GENEI <i>PvRPS4</i>	31
3.7. ANALIZA SECVENȚELOR GENEI <i>PvLEA3</i>	32
3.8. ANALIZA SPAȚIULUI INTERGENIC <i>rpoC1-rpoC2</i>	34
3.9. ANALIZA SPAȚIULUI INTERGENIC <i>trnL-trnT</i>	36
3.10. ANALIZA FILOGEOGRAFICĂ A SPECIEI <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L. CU AJUTORUL UNOR PARAMETRII MORFOLOGICI.....	37
3.11. EVALUAREA MORFOLOGICĂ A PLANTELOR SPECIEI <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L. DEZVOLTATE ÎN CONDIȚII DE SECETĂ	39
3.12. EVALUAREA PREPARATELOR MORFOANATOMICE, ALE VARIANTELOR SPECIEI <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L., DEZVOLTATE ÎN DIFERITE CONDIȚII DE MEDIU.....	41
3.12.1. Analiza secțiunilor morfoanatomice pentru varietatea SVGB-2087.....	41
3.12.2. Analiza secțiunilor morfoanatomice pentru varietatea SVGB-1988.....	44
3.12.3. Analiza secțiunilor morfoanatomice pentru varietatea Lechința.....	46
3.13. EVALUAREA PIGMENȚILOR ASIMILATORI AI PLANTELOR SPECIEI <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L. DEZVOLTATE ÎN CONDIȚII DE SECETĂ	48
3.14. EVALUAREA UNOR PARAMETRII FIZIOLOGICI AI PLANTELOR SPECIEI <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L. DEZVOLTATE ÎN CONDIȚII DE SECETĂ.....	49
3.15. EVALUAREA EXPRESIEI UNOR GENE IMPLICATE ÎN RĂSPUNSUL PLANTELOR SPECIEI <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L. LA CONDIȚII DE SECETĂ	50
3.15.1. Analiza expresiei unor gene funcționale implicate în răspunsul la secetă.....	50
3.15.1.1. Expresia relativă a genei <i>PvLEA3</i>	50
3.15.1.2. Expresia relativă a genei <i>PvP5CS10</i>	51
3.15.2. Analiza unor gene reglatorii implicate în răspunsul față de stresul hidric.....	51
3.15.2.1. Expresia relativă a genei <i>PvABA'8H</i>	51

3.15.2.2. Expresia relativă a genei <i>PvPP2C-12</i>	52
3.15.2.3. Expresia relativă a genei <i>PvDREB1</i>	53
3.15.2.4. Expresia relativă a genei <i>PvDREB2</i>	53
3.15.2.5. Expresia relativă a genei <i>PvDREB6</i>	54
3.15.2.6. Expresia relativă a genei <i>PvERF</i>	54
3.15.2.7. Expresia relativă a genei <i>PvMYB03</i>	55
3.15.2.8. Expresia relativă a genei <i>PvMYB07</i>	56
3.15.2.9. Expresia relativă a genei <i>PvMYC</i>	56
3.15.2.10. Expresia relativă a genei <i>PvWRKY53</i>	57
3.15.2.11. Expresia relativă a genei <i>PvWRKY57</i>	58
CONCLUZII	60
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	644

LISTA PRESCURTĂRILOR**Lista prescurtărilor:**

ADN= Acid Deoxiribonucleic

AFLP= Amplified Fragment Length Polymorphism

ARN= Acid Ribonucleic

FAO= Food and Agriculture Organisation

LD= Loading Dye

MW= Molecular Weight

PCR= Polymerase Chain Reaction

RT- qPCR= Reverse-Transcription quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

SNP= Single-Nucleotide Polymorphism

CBOL= Consortium for the Barcode of Life

ROS= Reactive Oxygen Species

LEA= Late Embryogenesis Abundant

CAM= Crassulacean Acid Metabolism

kDA= Kilodalton

JA= Jasmonic Acid

ABA= Abscisic Acid

UV= Ultraviolet

UV-VIS= Ultraviolet-Visible Spectroscopy

INTRODUCERE

Speciile vegetale sunt considerate, într-un mod aparte, plămâni Terrei. Plantele sunt o adevărată și importantă sursă de energie pentru existența și evoluția speciilor.

În procesul evolutiv al naturii, rolul cheie îi revine variației genetice. După cum a afirmat și Charles Darwin, *evoluția se datorează variației ereditare*. Teoretic, diferența dintre caracteristicile speciilor ancestrale și a descendenților este cauzată de variația genomică. Aceasta este o transformare genetică, indusă de procese precum mutația, recombinarea, transpoziția ADN sau procesele epigenetice și reprezintă materia de bază pentru procesele evolutive de selecție și adaptare (Rasmusson & Phillips, 1997).

Numeroasele activități antropice au produs efecte devastatoare asupra mediului, dintre acestea, procesul de extincție este considerat un real pericol pentru numeroase specii de plante și animale. Omul, de-a lungul existenței sale, a utilizat aproximativ 10.000 de specii de plante de cultură, dar potrivit ultimelor raportări ale FAO, la ora actuală, 90% din producția de alimente este asigurată de 120 de specii. Apariția agriculturii industrializate a produs o diminuare drastică a diversității specifice și în același timp un proces accentuat de eroziune genetică. Astfel, în defavoarea genotipurilor vechi și a varietăților locale, au fost dezvoltate soiurile moderne (Sæther, 2013), ceea ce nu reprezintă un aspect întru-totul negativ, randamentul producției este mult mai mare în cazul unor astfel de culturi, iar rezistența la factorii de stres biotic și abiotic poate fi superioară. Pe de altă parte, este extrem de important ca germoplasma vegetală a rudelor sălbatice și a populațiilor locale să fie conservată *ex situ*, pentru studiile viitoare, ce pot duce la identificarea unor cultivare tradiționale, valoroase din punct de vedere genetic.

Lumea în care trăim se dezvoltă cu o viteză amețitoare, ca într-un *roller coaster* și totul este afectat de tehnologizare și industrializare- omul, animalele, plantele. Zilnic, la nivel mondial, dispar numeroase specii de plante și animale, pe care omul nu le cunoaște și nici nu le va descoperi vreodată. Într-un raport, publicat pe data de 6 mai 2019, de către IPBES (*Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services*), se precizează că, natura se află într-un declin, iar rata de extincție a speciilor din regnul vegetal, dar și cel animal, se află la cel mai mare nivel din toate timpurile (<https://www.un.org/sustainabledevelopment/blog/2019/05/nature-decline>). Cunoașterea,

Înțelegerea, descoperirea naturii și încercarea de a trăi în armonie cu aceasta, ne va permite atât nouă, cât și generațiilor viitoare, să beneficiem de toată biodiversitatea. Pământul este casă pentru milioane de specii, fiecare adaptată la diferite condiții de mediu, cu specii unice în anumite zone și cu densitatea biodiversității variabilă în funcție de zona globală.

MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Motivația studiului. Tema abordată gravitează în jurul importanței și a potențialului enorm al speciei *Phaseolus vulgaris* L., precum și la necesitatea abordării unui management inteligent al valorificării și exploatării în sistemul agricol al acestei culturi. FAO afirmă că, specia *Phaseolus vulgaris* L. este cea mai importantă leguminoasă la nivel mondial. Această importanță derivă din aportul nutrițional furnizat consumatorului, de exemplu, concentrația proteinei variază între 23-33%, în funcție de varietate, iar aportul energetic este asigurat de conținutul mare al carbohidraților (peste 50%) (Hayat et al., 2014). Semințele de fasole sunt considerate un aliment cheie în regiunile defavorizate ale lumii, contribuind la securitatea alimentară a zonei. Studiile bazate pe cercetările genomului sunt esențiale în ceea ce privește înțelegerea proceselor fiziologice ale plantelor, precum și a modificărilor apărute la nivel morfologic, celular sau biochimic, atunci când organismele vegetale sunt expuse la factorii de mediu mai puțin favorabili creșterii și dezvoltării. Informațiile obținute pot fi esențiale, în special, pentru domeniul ameliorării și pot răspunde nevoilor actuale, în raport direct proporțional cu schimbările climatice și bineînțeles cu expansiunea populației la nivel global.

Modificările climatice provoacă schimbări bruște de temperatură sau perioade lungi de secetă, ceea ce afectează extrem de mult culturile indiferent de tipul acesteia, prin scăderea accentuată a randamentului de producție. Dacă vorbim despre producția de *Phaseolus vulgaris* L., aceasta poate fi afectată în proporție de 70% de lipsa apei (Polania et al., 2016). Motiv pentru care, studiile de cercetare, bazate pe identificarea unor variante cu rezistență crescută la diferiți factori de stres abiotic, în principal, la stresul hidric, sunt de mare importanță la ora actuală, iar descoperirile pot avea o importanță majoră, în crearea unor soiuri rezistente la condițiile climatice actuale.

Scopul tezei de doctorat este de a contribui la îmbogățirea cunoștințelor legate de cultura de *Phaseolus vulgaris* L., în ceea ce privește biogeografia speciei, colectate de pe teritoriul României și păstrată în colecția Băncii de Resurse Genetice Vegetale Suceava. De asemenea, se va urmări dacă originea geografică a probelor (Mezoamerica/Andean) are o influență în ceea ce privește rezistența speciei *Phaseolus vulgaris* L. la factorul de stres hidric, în contextul actual al schimbărilor climatice.

Pe baza afirmațiilor formulate privind scopul și obiectivele cercetării, dar și a informațiilor existente la ora actuală în literatura de specialitate, s-au verificat următoarele ipoteze:

Ipoteza 1. În prezent, pe teritoriul Europei și inclusiv în zona Balcanilor, specia *Phaseolus vulgaris* L. originară din bazinul geografic Andean are o prevalență mai mare, comparativ cu populațiile originare din regiunea geografică Mezoamerica;

Ipoteza 2. Populațiile de *Phaseolus vulgaris* L. originare din bazinul geografic Mezoamerica prezintă o rezistență superioară la factorul de stres hidric, prin mecanismele de adaptare pe care le dezvoltă, comparativ cu cele care au ca origine geografică arealul Andean.

Obiectivele și activitățile aferente celor 4 ani de studii doctorale:

O.1. Analiza relațiilor filogenetice și filogeografia probelor de *Phaseolus vulgaris* L. din colecția Băncii de Resurse Genetice Vegetale „Mihai Cristea” Suceava.

1.1. Selecția unui număr reprezentativ de probe de *Phaseolus vulgaris* L., de la nivel național, păstrate în colecția Băncii de Resurse Genetice Vegetale „Mihai Cristea” Suceava și stabilirea metodelor de lucru;

1.2. Germinarea probelor de *Phaseolus vulgaris* L., în condiții specifice de creștere și dezvoltare pentru obținerea țesutului foliar;

1.3. Izolarea și purificarea ADN din țesutul foliar;

1.4. Reacția în lanț a polimerazei, utilizând primeri specifici (nucleari și cloroplastici);

1.5. Secvențierea regiunilor amplificate și analiza datelor obținute pentru stabilirea relațiilor de filogenie dintre probele evaluate și identificarea originii geografice.

O.2. Analiza expresiei unor gene, implicate în creștere, dezvoltare și rezistența la stresul hidric, în cazul unor populații, originare din cele două bazine geografice, Mezoamerica și Andean, păstrate în colecția Băncii de Resurse Genetice Vegetale Suceava.

2.1. Germinarea probelor de *Phaseolus vulgaris* L., în diferite condiții experimentale;

2.2. Analiza unor parametrii fenotipici (greutate, înălțime), biochimici (clorofilă, carotenoide) și fiziologici (rata creșterii relative și conținutul relativ de apă);

2.3. Analiza expresiei unor gene de interes.

2.3.1. Izolarea și purificarea ARN;

2.3.2. Evaluarea expresiei unor gene (implicate în procesele de creștere și dezvoltare, dar și în răspunsul plantelor la factorul de stres hidric) prin metoda RT- qPCR;

2.3.3. Analiza datelor obținute prin cuantificarea relativă a expresiei genelor de interes.

O.3. Caracterizarea morfoanatomică a probelor de *Phaseolus vulgaris* L. expuse la un mediu slab hidric și a celor irigate constant pe toată durata experimentului.

3.1. Realizarea secțiunilor și analiza morfoanatomică a hipocotilului și epicotilului probelor de *Phaseolus vulgaris* L., dezvoltate în diferite condiții experimentale.

O.4. Diseminarea rezultatelor – publicarea în reviste de specialitate și participarea la manifestări științifice.

O.5. Redactarea și susținerea tezei de doctorat.

Prin urmare, în acord cu datele identificate în literatura de specialitate **rezultatele așteptate** sunt următoarele:

1. Frecvența mai mare a probelor de *Phaseolus vulgaris* L. originare din bazinul geografic Andean, comparativ cu cele din arealul Mezoamerica pe teritoriul României;
2. Populațiile cu origini Mezoamericane vor prezenta o rezistență mai bună la secetă, în comparație cu cele din arealul Andin.

Originalitatea studiului se bazează pe analiza filogenetică și filogeografică, a probelor de *Phaseolus vulgaris* L., din toate regiunile României. Un aspect foarte important, constă în importanța materialului biologic, acestea sunt populații locale ce nu au fost studiate până în prezent, iar unele probe se regăsesc în colecția Băncii de Resurse Genetice Vegetale Suceava de peste 35 de ani.

Limitele cercetărilor efectuate. Limitele cercetărilor efectuate în cadrul acestei lucrări de doctorat, au fost cauzate în mare parte de numărul redus și chiar absența unor cercetări similare la nivel internațional, în special în domeniul morfoanatomiei speciei *Phaseolus vulgaris* L., precum și în cel al biologiei moleculare, care să urmărească compararea unor secvențe din genomul nuclear și cloroplastic al populațiilor cu origini geografice diferite, aspect care a limitat discuțiile.

CAPITOLUL 1

1. STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU**1.1. PHASEOLUS VULGARIS L. - ASPECTE GENERALE ȘI CLASIFICAREA SISTEMATICĂ**

Conform celor afirmate de FAO, *Phaseolus vulgaris* L. este cea mai importantă leguminoasă la nivel mondial. Aceasta este o plantă anuală, erbacee și termofilă (Ciofu, 2004). Aproximativ 230 de specii sunt cunoscute ca făcând parte din genul *Phaseolus*, dintre care, doar 12 se cultivă pentru consumul uman, iar 8 în scop furajer, *Phaseolus vulgaris* L. fiind cea mai cunoscută specie. Genul *Phaseolus* face parte din familia *Fabaceae*, familie ce cuprinde aproximativ 770 de genuri și peste 19.500 de specii (Azani et al., 2017; Lewis et al., 2013). La ora actuală, plantele din familia leguminoaselor ocupă locul doi, din punct de vedere al suprafeței cultivate, la nivel mondial, imediat după cereale

Phaseolus vulgaris L. este un organism diploid ($n=11$) (Zheng et al., 1991), iar 60% din genomul acestei specii este alcătuit din secvențe unice (Talbot et al., 1984). Primele studii de genetică, care au utilizat *Phaseolus vulgaris* L., drept material biologic, au fost realizate de Gregor Mendel, în anul 1866. În ceea ce privește morfologia plantelor de *Phaseolus vulgaris* L., frunzele sunt trifoliolate, florile sunt papilionacee, zigomorfe (Singh et al., 1991). Pentru *Phaseolus vulgaris* L., procesul de germinație este de tip epigeal (cotiledoanele semințelor se situează la suprafața solului) și durează aproximativ 5-7 zile. Semințele mature de fasole sunt dehiscente (Berglund-Brücher & Brücher, 1976; Singh et al., 1991; Watts, 2012).

De-a lungul timpului, clasificarea taxonomică a speciei *Phaseolus vulgaris* L. a suferit numeroase modificări, în special cea a varietăților *vulgaris*:

- **Regnul:** *Plantae*;
- **Ordinul:** *Fabales*;
- **Familie:** *Fabaceae*;
- **Subfamilie:** *Faboideae*;

- **Gen:** *Phaseolus*;
- **Specie:** *Acutifolius*, *Coccineus*, *Longepedunculatus*, *Maculatus*, *Polystachios*, *Vulgaris*.

Conform NCBI (Taxonomy Browser) *Phaseolus vulgaris* se clasifică în două grupe diferite de **varietăți**:

- *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*;
- *Phaseolus vulgaris* var. *nanus*.

GRIN Global propune o clasificare ușor diferită, față de cea anterioară, pentru specia *Phaseolus vulgaris*:

- *Phaseolus vulgaris* L var. *aborigineus*;
- *Phaseolus vulgaris* L var. *vulgaris*.

1.2. IMPORTANȚA SPECIEI *PHASEOLUS VULGARIS* L.

Cea mai importantă leguminoasă, pentru consumul uman, la nivel mondial este reprezentată de *Phaseolus spp.*, în mod particular de *Phaseolus vulgaris* L. Importanța culturii de fasole este susținută prin 3 argumente:

- ✓ **compoziția chimică:** semințele sunt bogate în proteine, fibre, complex de carbohidrați, micro și macronutrienți (Anonymous, 2001; Reinprecht et al., 2020);
- ✓ **relația de simbioză** dintre *Phaseolus* și *Rhizobium*, permite fixarea azotului (N₂) atmosferic în sol (Reinprecht et al., 2020);
- ✓ **ușurința de a produce și întreține** o cultură de *Phaseolus vulgaris*; costurile și cerințele față de condițiile pedo-climatice sunt moderate (Myers, 2017).

1.3. RĂSPÂNDIRE ȘI CULTIVARE

Semințele de fasole reprezintă sursa principală de hrană pentru milioane de oameni la nivel mondial. Cei mai mari producători de fasole boabe sunt India și Brazilia, iar China ocupă locul I mondial, în ceea ce privește producția de fasole verde (<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/>). Conform graficelor prezentate mai jos, interesul pentru cultura de *Phaseolus vulgaris* L. a crescut la nivel mondial, dar a scăzut dramatic la nivel național (Figura 1.1).

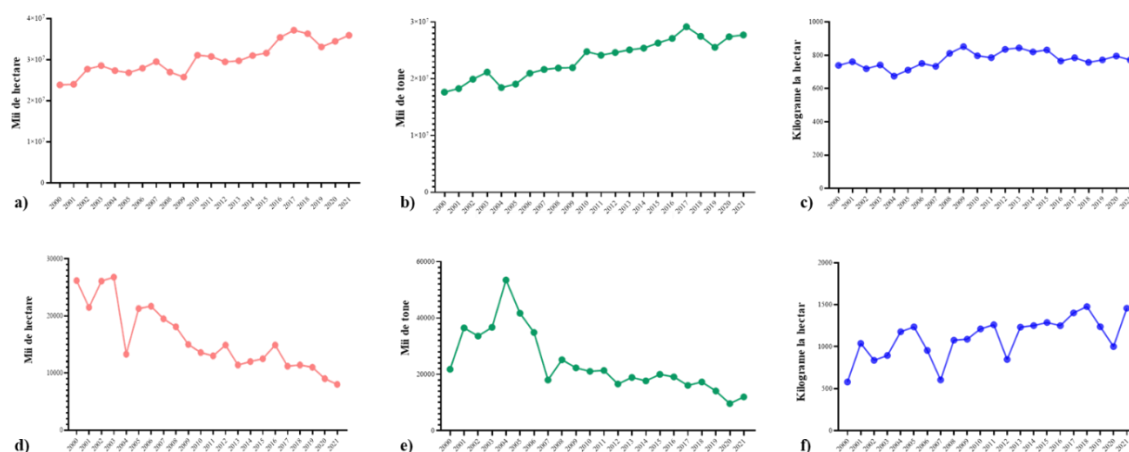


Figura 1.1. Reprezentarea grafică a producției de fasole boabe, a suprafeței cultivate și a randamentului producției la nivel mondial și național: a) suprafața cultivată la nivel mondial (fasole boabe), între anii 2000-2021; b) producția la nivel mondial (fasole boabe), între anii 2000-2021; c) randamentul producției la nivel mondial (fasole boabe), între anii 2000-2021; d) suprafața cultivată în România (fasole boabe), între anii 2000-2021; e) producția în România (fasole boabe), între anii 2000-2021; f) randamentul producției de fasole boabe în România, între anii 2000-2021

1.4. FILOGEOGRAFIA

Cunoașterea originii și a zonelor de domesticire pentru speciile din regnul vegetal este un subiect de interes pentru cercetătorii din domeniul evoluției, dar și de importanță practică pentru agricultură și domeniul conservării *in situ*, cât și *ex situ*, chiar dacă procesul în sine este unul dinamic și în continuă dezvoltare (Zohary, 1999). Filogeografia permite identificarea populațiilor de plante refugiate, a blocajelor demografice ale organismelor vegetale sau extinderii/restrângerii unor specii. Pe de altă parte, filogeografia poate răspunde și la întrebările legate de izolarea unor populații, de barierele de mediu sau de distanțele geografice (Hickerson et al., 2010).

Specia *Phaseolus vulgaris* L. a fost descrisă pentru prima dată, din punct de vedere botanic în anul 1542, drept dovadă stau anumite manuscrise numite ierbare, descoperite în Europa. În regiunea Valea Tehucan, Mexic, în situri arheologice au fost descoperite fragmente provenite de la *Phaseolus vulgaris* L., vechi de aproximativ 7000 de ani și s-a dovedit că aceste plante suferiseră până în acel moment, procesul de domesticire (Kaplan, 1999). *Phaseolus vulgaris* L. își are originea în două bazine geografice, centrul Americii (bazinul Mezoamerica), ce este cunoscut azi ca fiind regiunea întinsă din Mexic până în Panama, iar cel de-al doilea bazin este reprezentat de sudul Americii (bazinul Andean), regiunea întinsă din nord-estul Columbiei, până în Argentina (Chacon et al., 2007). Spre deosebire de bazinul geografic Andean, cel din Mezoamerica prezintă o diversitate genetică

mai mare. *Phaseolus vulgaris* L. din Mezoamerica a fost introdusă în Europa în jurul anului 1506 prin Spania și Portugalia (Watts, 2012), iar cea din Andean, a urmat același traseu de pătrundere pe continentul European, dar câțiva ani mai târziu, în 1528, după perioada de explorare de către Pizzaro în Peru (Berglund-Brücher & Brücher, 1976). Determinarea originii geografice a populațiilor speciei *Phaseolus vulgaris* L. se poate realiza prin evaluarea unor secvențe specifice din genomul nuclear sau cloroplastic (Bitocchi et al., 2012; Konzen et al., 2019; Vidak et al., 2021).

1.5. FILOGENIE ȘI DIVERSITATE GENETICĂ

Civilizația modernă depinde de câteva specii de plante, pentru a-și asigura hrana. Culturile actuale au fost obținute pe parcursul a mii de ani, timp în care omul a intervenit prin procese de selecție artificială, iar mediul înconjurător prin selecție naturală, transformând astfel, strămoșii sălbatici, în descendenți domestici (Rendón-Anaya et al., 2017). Diversitatea genetică este considerată motorul principal al evoluției, atât la nivel genotipic, cât și la nivel fenotipic, aceste schimbări fiind influențate de condițiile mediului înconjurător (Henry, 2005b). Filogenia în schimb, este o ramură a biologiei, ce are drept scop studiul istoriei sau evoluției unui organism, dar permite în același timp și stabilirea relațiilor dintre indivizii unui grup sau a celor din grupuri diferite (Yang et al. 2012).

1.6. STRESUL HIDRIC

Phaseolus vulgaris L. este o cultură importantă la nivel mondial, iar stresul biotic și abiotic pot să ducă la scăderea randamentului producției de fasole, cu până la $<600 \text{ kg/ha}^{-1}$ (Porch et al., 2013). Creșterea accelerată a populației se află într-un raport direct proporțional cu intensificarea cererii de alimente, iar încălzirea globală are ca efect scăderea producției din sectorul agricol, din cauza diminuării cantităților de precipitații și a temperaturilor ridicate, lucru ce produce, în final fenomenul de insecuritate alimentară, în special în țările subdezvoltate.

1.6.1. Mecanismele de răspuns ale organismelor vegetale supuse stresului hidric și efectele produse

Seceta este considerată cel mai mare factor de stres abiotic, ce limitează creșterea și dezvoltarea plantelor prin alterarea activităților metabolice și biologice (Hrmova & Hussain, 2021; Konzen et al., 2019; Mahmood et al., 2020; X. Yang et al., 2021). În momentul de față, aproximativ 45% din terenurile agricole ale lumii, unde este recențată în jur de 38% din populația umană, sunt supuse unei secete frecvente sau continue. Fiecare etapă a creșterii plantelor este dependentă de apă, de la procesul germinativ, până la faza de maturitate a plantelor, lipsa acesteia produce scăderea producției, iar consecințele socio-economice pot avea o mare amploare (Hussain et al., 2012). Organismele vegetale pot răspunde factorului de stres hidric, prin două mecanisme, clasificate în funcție de timpul de răspuns, astfel:

- **răspunsul pe termen lung;**
- **răspunsul pe termen scurt** (Tardieu et al., 2018).

1.6.2. Efectele produse de stresul hidric în plante - modificări morfologice

Când organismele vegetale sunt supuse stresului hidric, primele modificări apărute sunt cele la nivel morfologic sau mai bine spus apar schimbări în **structura externă** (țesutul foliar, tulpina, sistemul radicular) și **internă** a plantei. Primele semne vizibile ale deficitului de apă sunt reprezentate de o încetinire a creșterii, iar în final, apare fenomenul de moarte al plantelor. Organismele vegetale se adaptează în timp la condițiile pedo-climatice, un exemplu elocvent, în acest sens este cel al xerofitelor¹ (Yang et al., 2021). Atunci când plantele sunt lipsite de apă, talia acestora devine mai mică, frunzele se ofilesc, iar numărul și aria suprafeței foliare sunt cu mult reduse (Anjum et al., 2017; Marais, 2017; Nasir & Toth, 2021; Patmi et al., 2020). Rădăcinile au o capacitate remarcabilă de a sesiza și de a răspunde în cele din urmă unor parametri fizico-chimici din sol, prin ajustarea dezvoltării lor și implicit prin absorbția apei. Creșterea lungimii și densității sistemului radicular, în cazul organismelor vegetale, sunt considerate mecanisme de adaptare la secetă (Bengough et al., 2006).

¹ *Xerofitele*- sunt specii de plante capabile să supraviețuiască în zone unde cantitățile de apă sunt mici, precum zonele deșertice sau regiunile acoperite de zăpadă sau gheață din regiunea munților Alpi sau Arctica. În această categorie de organisme vegetale este inclus cactusul, ananasul și unele specii de *Gymnosperme*.

1.6.3. Efectele produse de stresul hidric în plante - modificări fiziologice și biochimice

Când plantele sunt private de sursa de apă, acestea suferă o serie de modificări, nu doar la nivel morfologic, ci și la nivel fiziologic și biochimic. În această categorie intră schimbările legate de fotosinteză, de substanțele de reglare osmotică, sunt implicate și proteinele induse de secetă, dar și enzimele antioxidante și diferiți fitohormoni (Yang et al., 2021). Alte modificări ce pot să apară la nivel fiziologic sunt legate de conținutul relativ al apei (RWC), dar și de rata relativă de creștere (RGR). Astfel, la *Phaseolus vulgaris* a fost raportată o scădere a valorii RGR la plantele ce nu au fost irigate, în comparație cu cele hidratate corespunzător (Costa et al., 2000) și de asemenea a fost indicată și o scădere a conținutului de apă, la nivelul țesutului foliar, în cazul loturilor stresate hidric.

1.6.3.1. Fotosinteza

Fotosinteza este unul dintre procesele biologice esențiale pentru supraviețuirea organismelor vegetale. Seceta poate reduce fenomenul de fotosinteză prin scăderea suprafeței foliare, dar și a ratei fotosintetice (Arunyanark et al., 2008; Razi & Muneer, 2021; Yang et al., 2021).

1.6.3.2. Reglarea osmotică

Substanțele osmoprotectoare sau osmoliții sunt definiți ca fiind niște molecule mici, care ajută organismele vegetale să depășească mult mai ușor perioadele dificile și să supraviețuiască în condiții de stres osmotic sever. (Hussain et al., 2013). Acumularea osmoprotectorilor în plante, în timpul stresului hidric este unul dintre răspunsurile imediate și este esențială pentru menținerea presiunii de turgescență (Ozturk et al., 2021).

1.6.3.3. Proteine sintetizate în perioadele de secetă

În timpul perioadelor de secetă, plantele pot sintetiza o serie de proteine cu rol protector, îmbunătățind toleranța organismelor vegetale la secetă. Aceste proteine pot fi clasificate în: proteine funcționale și proteine reglatorii. Din prima categorie, cea a proteinelor funcționale, fac parte proteinele *LEA*, proteinele membranare, proteinele *OSM*,

enzimele metabolice ș.a., acestea având un rol important în protejarea directă a structurilor celulare. În schimb, proteinele de reglare sunt reprezentate de protein kinaze, fosfolipaza C, calmodulina, factorii de transcripție, dar și de factorii de semnalizare, toate aceste tipuri de molecule fiind implicate în căile de transmitere ale semnalelor la nivel molecular sau în reglarea expresiei genelor, iar rolul lor de protecție devine indirect (Yang et al., 2021).

1.6.3.4. Producția speciilor reactive de oxigen (ROS) și sistemele de eliminare ale acestora în timpul perioadelor de secetă

În condiții normale, plantele produc specii reactive de oxigen (*ROS*), în limite admise, încât sistemele de îndepărtare ale acestor molecule, sunt eficiente. În schimb, în perioadele de secetă, plantele produc o cantitate mult mai mare de specii reactive de oxigen, iar mecanismele de eliminare a *ROS* pot fi depășite (Yang et al., 2021). Cele mai susceptibile molecule față de deteriorarea radicalilor liberi de la nivel celular sunt reprezentate de proteine, lipide și carbohidrații (Blokhina et al., 2003), dar *ROS* pot să interacționeze cu purinele și pirimidinele din molecula de ADN și pot provoca ruperea, degradarea și modificarea moleculelor dublucatenare (Marnett, 2000). Indirect, speciile reactive de oxigen pot opri creșterea și dezvoltarea plantelor, prin inactivarea unor enzime.

1.6.3.5. Fitohormonii cu implicații în stresul hidric

Acidul abscisic (*ABA*) este un hormon vegetal, iar implicațiile și efectele produse, atât în condiții normale, cât și în diferite condiții de stres biotic și abiotic în celula vegetală, au fost intens studiate de-a lungul timpului. *ABA* este un fitohormon cu rol în declanșarea multor procese fiziologice, inclusiv de repaus meristematic, de germinare a semințelor, de închiderea stomatică sau de reglare a expresiei unor gene sensibile la factorii de stres (Ali et al., 2020).

1.6.4. Efectele produse de stresul hidric în plante – modificări la nivel molecular

Organismele vegetale pot să supraviețuiască și să se dezvolte în perioadele de stres hidric, datorită unor mecanisme de adaptare. Angiospermele sunt capabile să recepționeze semnalele produse de lipsa apei. Ulterior, transducția semnalelor are loc prin diferite căi la

nivel celular, iar efectul este de sinteză a unor molecule ce produc modificări fiziologice, biochimice și morfologice, care se reflectă în rezistența plantelor în perioadele de secetă. În timpul perioadelor de stres hidric, la plante se pot activa numeroase gene care au rolul de a proteja organismele vegetale față de factorii stresori. Astfel, s-a realizat o clasificare a acestor gene, în funcție de rolul și acțiunea directă sau indirectă produsă, în: gene funcționale și gene cu rol reglator. În prima categorie, a genelor funcționale, intră secvențele ce codifică proteinele cu rol protector (acvaporine, LEA, proteinele chaperone), factorii de osmoreglare (prolina, betaina, diferite glucide) sau genele sintetazei. Genele cu rol reglator sunt implicate în procesul de transducție al mesajului și în reglarea expresiei genelor, acestea au un rol indirect în apărarea plantelor în perioadele de secetă (Yang et al., 2021).

CAPITOLUL 2**2. MATERIALE ȘI METODE****2.1. MATERIALUL BIOLOGIC**

Materialul biologic utilizat este reprezentat de populații locale ale speciei *Phaseolus vulgaris* L. Probele analizate au fost colectate din diferite zone de pe teritoriul României și sunt păstrate, la ora actuală, în colecția Băncii de Resurse Genetice Vegetale „Mihai Cristea” Suceava. În cadrul acestui studiu au fost studiate 27 de varietăți din specia *Phaseolus vulgaris* L. Selecția materialului biologic s-a realizat pe baza următoarelor criterii: culoarea probelor să fie albă; forma și mărimea semințelor de *Phaseolus vulgaris* L. să fie ușor asemănătoare; germoplasma vegetală să provină din județe diferite ale României.

Studiul privind rezistența la stresul hidric a populațiilor locale de *Phaseolus vulgaris* L. cu origini geografice diferite (Andean/Mezoamerica), a impus selecția unui număr mai mic de probe. Astfel, trei varietăți (SVGB-1988 - origine Andină, SVGB-2087 - origine Mezoamericană și varianta Lechința, reprezentând controlul pozitiv, varietatea se află în colecția Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare pentru Legumicultură Bacău) au fost crescute în condiții normale de irigare (loturile martor) și expuse la secetă (loturile stresate hidric).

2.2. METODELE DE LUCRU**2.2.1. Analiza morfologică a semințelor de *Phaseolus vulgaris* L.**

Anterior dezvoltării domeniului biologiei moleculare, determinarea originii geografice a probelor speciei *Phaseolus vulgaris* L. era realizată prin măsurarea masei a 100 de boabe sau prin aprecierea macroscopică a formei semințelor. Astfel, semințele mici (M100 < 25 g) erau considerate ca având origine Mezoamericană, iar cele medii (M100 25-40 g) și mari (M100 > 40 g) origine Andină (Cichy et al., 2015). Analiza morfologică a

semințelor de *Phaseolus vulgaris* L. a presupus determinarea unor trăsături cantitative și calitative, precum, lungimea semințelor, lățimea, înălțimea, masa a 100 de semințe, greutatea, indexul de planeitate (Flatness Index- FI) și indexul de excentricitate (Eccentricity Index- EI), culoarea și forma germoplasmei. Din fiecare populație au fost selectate aleatoriu și ulterior analizate câte 20 de semințe.

2.2.2. Germinația probelor de *Phaseolus vulgaris* L.

Semințele evaluate în etapa anterioară, din punct de vedere morfologic, au fost puse la germinat, în scopul obținerii țesutului foliar, utilizat în reacția de izolare și purificare ADN. Inițial, semințele au fost dezinfectate cu o soluție de hipoclorit de sodiu, de 1%. Germinarea s-a realizat în condiții controlate de temperatură și umiditate (25°C și 80%).

2.2.3. Izolarea și purificarea ADN

Izolarea și purificarea ADN s-a realizat cu ajutorul kit-ului *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega), din țesutul foliar, obținut în urma etapei de germinare a semințelor de *Phaseolus vulgaris* L.

2.2.4. Cuantificarea acizilor nucleici

În studiul de față, concentrația și puritatea ADN a fost determinată cu ajutorul spectrofotometrului de tip *NanoDrop One, ThermoScientific*.

2.2.5. Amplificarea unor regiuni codificatoare și spații intergenice pentru studiul filogeniei și filogeografiei variantelor de interes

Inițial au fost amplificate 13 regiuni de la nivelul genomului nuclear și cloroplastic: 5 regiuni codificatoare din genomul nuclear (*PvLEA3*, *PvDREB1*, *PvDREB2A*, *PvDREB5A*, *PvDREB6B*) și 8 gene și spații intergenice de la nivelul genomului cloroplastic (*rpoC1-rpoC2*, *trnL-trnF*, *trnT-trnL*, *accD*, *rps4*, *rps14-psbaB*, *trnL*, *rpl16*). În final, au fost selectate doar 6 regiuni codificatoare și spații intergenice, (*PvLEA3*, *PvDREB6B*, *PvDREB5A*, *rpoC1-rpoC2*, *rps4*, *trnL-trnT*) pentru studiul filogeografiei și relațiilor filogenetice dintre populații.

Amplificarea regiunilor de interes a fost realizată cu ajutorul mix-ului *GoTaq® Green Master Mix* (Promega).

2.2.6. Electroforeza ADN în gel de agaroză

Electroforeza în gel de agaroză este o tehnică calitativă utilizată în studiul de față pentru evaluarea ADN genomic și pentru validarea produșilor PCR. Fragmentele ADN au migrat între 80 și 120 și minute, iar valoarea voltajului a fost cuprinsă în intervalul 55-75V, în funcție de tipul ADN migrat (genomic, ampliconi). Sistemele de electroforeză și de vizualizare utilizate în acest caz sunt *Wide Mini-Sub Cell GT Cell, BioRad* și *GelDoc Go Imaging System, BioRad*.

2.2.7. Purificarea produșilor PCR

Purificarea produșilor PCR s-a realizat cu ajutorul kit-ului *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

2.2.8. Secvențierea SANGER

Reacția de secvențiere a fost realizată pentru cele 6 regiuni nucleare și cloroplastice, în ambele direcții pentru secvențele *PvDREB6B*, *PvLEA3*, *trnL-trnT* și *rpoC1-rpoC2* și în direcția *reverse* pentru *PvRPS4* și *PvDREB5A*. Au fost analizați câte 3 indivizi din toate cele 27 de populații locale luate în studiu. Metoda de secvențiere Sanger a fost externalizată și s-a efectuat în cadrul laboratorului CeMIA, Grecia.

2.2.9. Designul experimental

Au fost stabilite 12 loturi a câte 5 indivizi, fiecare varietate fiind reprezentată de 2 loturi martor și 2 loturi experimentale stresate hidric, care au constituit 2 experimente: unul derulat pe o perioadă de 30 de zile, iar al doilea timp de 34 de zile. Un lot martor a fost irigat zilnic, timp de 30 de zile, iar în cazul celui de-al doilea lot martor, irigarea s-a realizat timp de 34 de zile. Loturile stresate hidric au fost alcătuite astfel: ambele loturi au fost irigate până

în ziua 22 (faza de creștere V2), iar ulterior a fost aplicat stresul hidric, timp de 8 zile (experimentul I – 30 zile) și respectiv 12 zile (experimentul II – 34 zile).

2.2.10. Evaluarea morfologică a plantelor de *Phaseolus vulgaris* L.

Au fost efectuate determinări privind înălțimea totală a plantei, lungimea sistemului radicular, înălțimea părții supratere, greutatea biomasei sistemului radicular, a biomasei lăstarului și respectiv greutatea totale. Determinările au fost efectuate pentru toți indivizii din loturile experimentale.

2.2.11. Analiza morfoanatomică a indivizilor speciei *Phaseolus vulgaris* L. din loturile martor și loturile neirigate

Pentru evidențierea diferențelor de la nivel morfoanatomic a fost utilizată metoda de lucru în microscopia fonică. Observațiile au fost efectuate în secțiunea transversală a părților hipocotilare și epicotilare pentru indivizii din cele trei populații studiate. Pentru vizualizarea structurilor celulare a fost necesară dubla colorare a preparatelor cu verde iod (pentru evidențierea ligninei) și roșu de Rutheniu (pentru evidențierea celulozei și pectinei). Ulterior, secțiunile colorate au fost examinate în picătura de apă (preparat provizoriu), cu ajutorul microscopului binocular Novex.

2.2.12. Cuantificarea unor compuși biochimici

Concentrația pigmentilor asimilatori, clorofilă *a*, clorofilă *b* și carotenoide, a fost determinată spectrofotometric, folosind metoda elaborată de către Nayek și colaboratorii, (Nayek et al., 2014), cu ajutorul spectrofotometrului *PG Instruments T70 UV/VIS Spectrophotometer, Wibtsoft, UK*, la lungimile de undă 665.2 nm, 652.4 nm și 470 nm. Determinările au fost efectuate pentru toți indivizii din loturile experimentale.

2.2.13. Determinarea unor parametri fiziologici

Au fost evaluați parametri fiziologici precum **rata relativă a creșterii plantelor** (*relative growth rate* – RGR) (Lizana et al., 2006) și **conținutul relativ de apă** (*relative water content* - RWC) (Qayyum et al., 2021).

2.2.14. Izolarea și purificarea ARN

ARN a fost izolat din țesutul foliar și radicular, atât pentru plantele din loturile martor, cât și din cele stresate hidric, cu ajutorul kit-ului, *SV Total RNA Isolation System* (Promega).

2.2.15. Real Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

Cuantificarea expresiei genelor de interes (*PvLEA3*, *PvDREB1*, *PvDREB2A*, *PvDREB6B*, *PvABA8'H*, *PvPP2C-12*, *PvP5CS10*, *PvWRKY53*, *PvWRKY57*, *PvMYB03*, *PvMYB07*, *PvMYC*, *PvERF*, *PvACT* - housekeeping) a fost realizată prin metoda RT-qPCR, utilizând kit-ul *qRT-PCR- GoTaq® 1-Step RT-qPCR System*, Promega și sistemul de amplificare și detecție *CFX96 BioRad*. Rezultatele au fost exprimate sub forma $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

CAPITOLUL 3

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII**3.1. EVALUAREA PROCESULUI GERMINATIV**

Cele 27 de populații de *Phaseolus vulgaris* L. au germinat în proporție de 100% (Figura 3.1), în condiții de temperatură și umiditate specifice speciei, pe de altă, parte viteza de germinație a fost diferită în funcție de varietate. Evaluarea germinației a fost efectuată în ziua 4 și ziua 8. În ziua 4 probele au prezentat un procent germinativ cuprins între 56-70%, iar în ziua 8, valoarea acestuia a variat între 95-100%. Probele au fost lipsite de orice contaminanți și au fost menținute în cadrul germinatorului, în condiții favorabile de creștere și dezvoltare până în ziua 20.

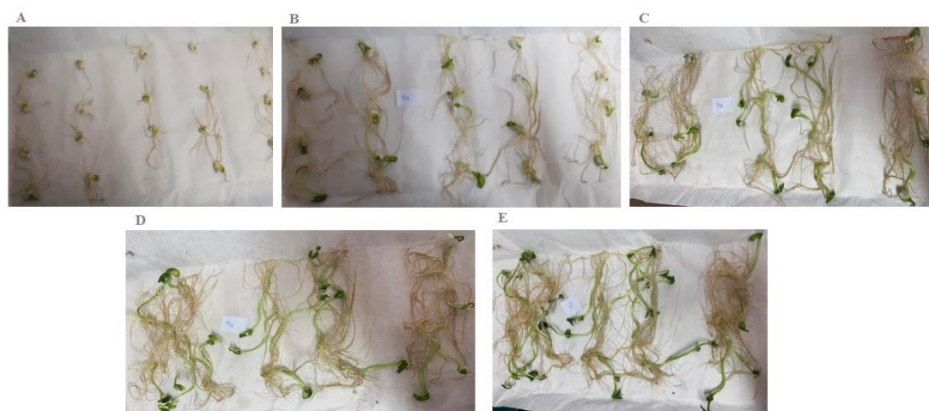


Figura 3.1. Stadiile de creștere și dezvoltare ale probei SVGB-5513, după germinare: **A** – 2 zile după germinația probelor (10 zile din momentul în care probele au fost puse la germinat); **B** - 5 zile după germinația probelor (13 zile din momentul în care probele au fost puse la germinat); **C** - 7 zile după germinația probelor (15 zile din momentul în care probele au fost puse la germinat); **D** - 9 zile după germinația probelor (17 zile din momentul în care probele au fost puse la germinat); **E** - 12 zile după germinația probelor (20 zile din momentul în care probele au fost puse la germinat).

3.2. EVALUAREA CANTITATIVĂ ȘI CALITATIVĂ A ADN**3.2.1. Cuantificarea spectrofotometrică a ADN – evaluare cantitativă și calitativă**

Concentrația ADN genomic a avut valori cuprinse între 347,4 ng/μl (SVGB-3076, individ 2) și 605,7 ng/μl (SVGB-2087, individ 1). Raportul A260/A280 pentru ADN

genomic a variat între 1,70-1,89; cu mici excepții, când valoarea raportului a fost inferioară pragului minim de 1,7 (1,6-1,69); pe de altă parte, raportul A260/A230 a avut valori cuprinse între 1,81-2,05. Concentrația ampliconilor PCR a fost cuprinsă în intervalul 9,79-51,2 ng/μl. Raportul A260/A280 în acest caz, a fost cuprins între 1,72-1,92 și cel al A260/230 a variat între 1,80-2,07.

3.2.2. Evaluarea calitativă a ADN prin electroforeză în gel de agaroză

Pentru verificarea integrității și purității ADN genomic au fost realizate migrări în gelul de agaroză. Cu ajutorul acestei metode a fost apreciată mărimea fragmentelor, prin compararea cu un marker molecular cu greutate cunoscută (MW-1 kb) (Figura 3.2).

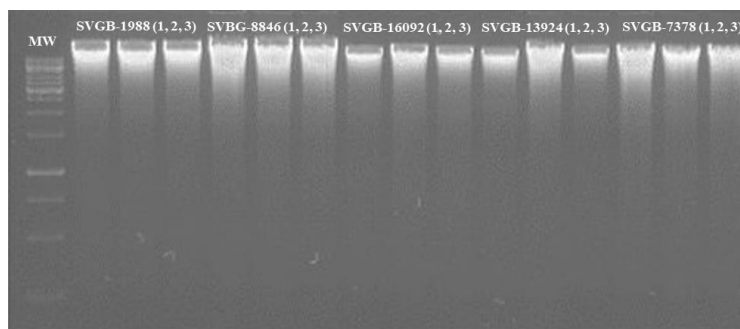


Figura 3.2. Electroforegrama ADN genomic, pentru trei indivizi din cadrul a 5 populații de *Phaseolus vulgaris* L. (SVGB-1988, SVBG-8846, SVGB-16092, SVGB-13924, SVGB-7378); concentrația gelului de agaroză 1,5%; migrarea - 120 minute, 70V; 5 μl M.W. - 1 kb; 2 μl L.D. +5 μl ADN

3.3. AMPLIFICAREA PCR A SECVENȚELOR DE INTERES ȘI VALIDAREA AMPLICONILOR PRIN ELECTROFOREZĂ

Amplificarea celor șase regiuni, din genomul cloroplastic (*trnL-trnT*, *rpoC1-rpoC2*, *PvRPS4*) și din genomului nuclear (*PvDREB5A*, *PvDREB6B*, *PvLEA3*) a fost realizată conform procedurilor exemplificate în Capitoul 2, Materiale și Metode. Reacția de amplificare a generat doar fragmentele ADN de interes, *PvDREB5A*, *PvDRE6B*, *PvLEA3*, *trnL-trnT*, *rpoC1-rpoC2* și *PvRPS4*, fiind exclusă existența unor produși nespecifici (Figura 3.3).

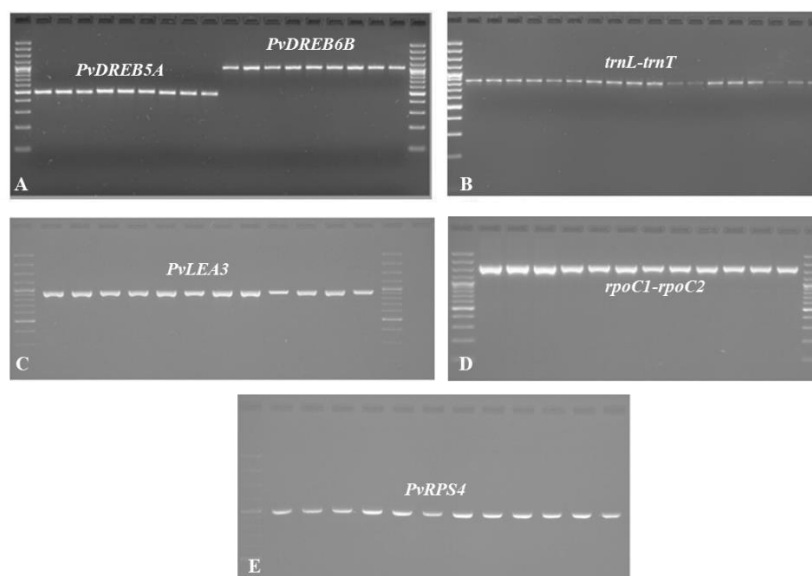


Figura 3.3. Electroforegramele ampliconilor PCR pentru trei indivizi din diferite populații de *Phaseolus vulgaris* L.: **A** –*PvDREB5A* și *PvDREB6B* (SVGB-1988, SVGB-11599, SVGB-2087); **B** –*trnL-trnT* (SVGB-1988, SVGB-11599, SVGB-2087, SVGB-10528, SVGB-11642, SVGB-9114); **C** - *PvLEA3* (SVGB-1988, SVGB-11599, SVGB-2087, SVGB-10528); **D** - *rpoC1-rpoC2* (SVGB-1988, SVGB-11599, SVGB-2087, SVGB-10528); **E** - *PvRPS4* (SVGB-1988, SVGB-11599, SVGB-2087, SVGB-10528); concentrația gelului de agaroză 2,5%; migrarea ampliconilor PCR 120 minute, 55V, 5 μ l M.W. – 1 kb; 2 μ l L.D. +5 μ l ADN

3.4. ANALIZA SECVENȚELOR GENEI *PvDREB5A*

Secvența *PvDREB5A* este o regiune scurtă, codificatoare, de la nivelul genomului nuclear, ce poate furniza informații cu privire la originea geografică a probelor de fasole (483 pb – lungimea este caracteristică probelor de *Phaseolus vulgaris* L. originare din regiunea geografică Mezoamerica, iar 474 pb - lungimea este caracteristică probelor de *Phaseolus vulgaris* L. originare din regiunea geografică Andean) (Konzen et al., 2019). În urma reacției de secvențiere, în cazul celor 81 de indivizi, (27 de populații) ce aparțin speciei *Phaseolus vulgaris* L., din cele 27 de județe ale României, au rezultat următoarele:

- 81,5% dintre populațiile luate în studiu, au origini Mezoamericane (22 de populații dintre cele analizate) (Galan et al., 2023);
- 5 populații (SVGB-1988, SVGB-18290, SVGB-11642, SVGB-14245, SVGB-15078) dintre cele analizate sunt originare din Andean, lungimea secvenței fiind 474 pb (Figura 3.4).

Bazinul geografic	Denumire proba	Poziția în cadrul ORF													
		-55	-75	-76	-77	-78	-79	-80	-81	-82	-83	-84	-85		
Andean	SVGB-1988	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	C
	SVGB-18290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SVGB-11642	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SVGB-14245	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SVGB-15078	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Midas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	UCD 0801	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mezoamerica	SVGB-7586	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-8846	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-9076	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-2911	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-15263	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-9114	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-8726	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-8749	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-2834	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-5425	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-11567	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-8513	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-14769	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-9916	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-2087	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-16528	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-11599	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-14022	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-7378	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-8740	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-13924	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	SVGB-16092	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	G12873	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-
	BAT 93	C	G	C	A	A	C	A	G	C	A	-	-	-	-

Figura 3.4. Alinierea secvențelor nucleotidice *PvDREB5A*, pentru cele 27 de populații locale de *Phaseolus vulgaris* L. Genotipurile *Midas*, *UCD 0801* au origini Andine, iar *G12873* și *BAT 93* sunt originare din bazinul Mezoamerica (Konzen et al., 2019). Variațiile de tip SNP specifice genofondului Andin au fost evidențiate cu portocaliu, iar cele originare din bazinul Mezoamerica sunt marcate cu verde

Distribuția celor 27 de populații locale de *Phaseolus vulgaris* L. este relativ uniformă pe teritoriul României, în cazul populațiilor cu origini în Mezoamerica; pe când probele originare din bazinul geografic Andean sunt concentrate în partea central-nordică a României: Suceava (SVGB-1988), Sălaj (SVGB-15078), Alba-Iulia (SVGB-14245), Vaslui (SVGB-11642) și Harghita (SVGB-18290) (Figura 3.5).

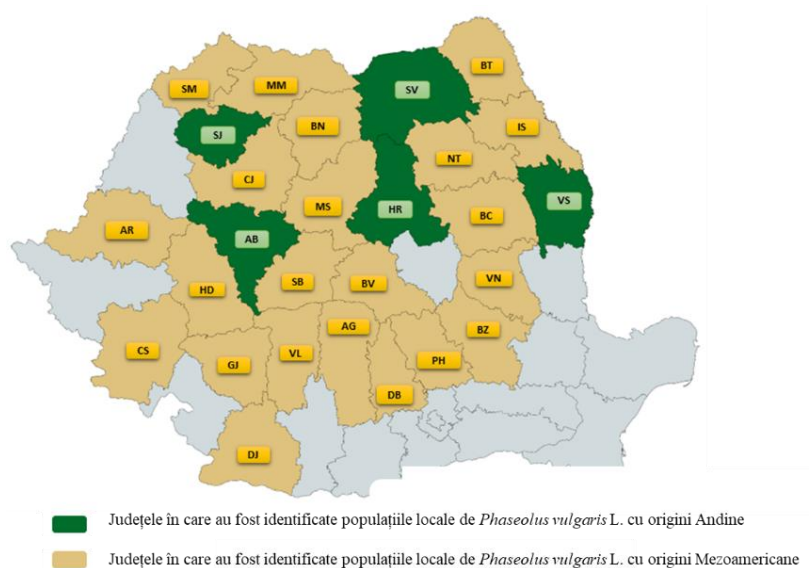


Figura 3.5. Distribuția celor 27 de populații locale de *Phaseolus vulgaris* L., pe teritoriul României, în funcție de originea geografică: bazinul geografic Andean/ bazinul geografic Mezoamerica

Separarea cladistică și evoluția istorică generată prin metoda *Neighbour-Joining*, în cazul fragmentelor *PvDREB5A*, a oferit informații privind gradul de asemănare dintre cele 27 de populații de *Phaseolus vulgaris* L evaluate. Au fost generate două clade, după cum urmează: culoarea verde marchează grupul în care au fost încadrate populațiile originare din bazinul geografic Mezoamerica, iar în partea de jos a arborelui filogenetic, marcate cu roșu, au fost clasificate probele de fasole originare din bazinul geografic Andean. Distanțele genetice au fost determinate prin metoda *Maximum Composite Likelihood* și de asemenea, pentru determinarea gradului de confidență a fost utilizat testul statistic Bootstrap (1000 de replicări) (Figura 3.6).

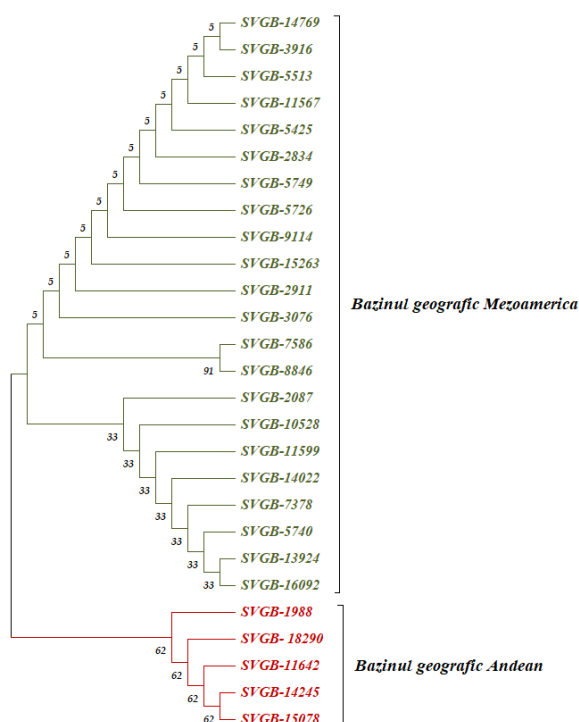


Figura 3.6. Arbore filogenetic- Metoda *Neighbor-Joining* - Secvențele genei *PvDREB5A*. Populațiile marcate cu roșu provin din bazinul geografic Andean, iar cele cu verde din bazinul geografic Mezoamerica

3.5. ANALIZA SECVENȚELOR GENEI *PvDREB6B*

Gena care codifică proteina *DREB6B* (*Dehydration-Responsive Element-Binding Protein*) este un factor de transcripție în plante, iar rolul său principal este de a activa expresia unor gene implicate în mod direct în rezistența la stresul hidric.

În cazul studiului de față a fost amplificată și secvențiată regiunea *PvDREB6B* pentru cele 27 de populații (3 indivizi/populație). Datele obținute din analiza secvențelor nucleotidice au evidențiat următoarele:

- în cadrul secvenței *PvDREB6B* a fost identificat un număr mare de situri polimorfe, 16, o parte specifice grupului (Andean/Mezoamerica) (Figura 3.7);
- o parte dintre mutațiile punctiforme identificate în secvența *PvDREB6B* produc schimbări în structura proteică, prin modificări ale aminoacizilor codificați. Zece SNP au dus la modificarea aminoacizilor, în structura proteică, în funcție de originea geografică a *Phaseolus vulgaris* L.; astfel pentru populațiile locale de fasole originare din bazinul geografic Andean a fost identificată izoleucina și glutamina, iar pentru populațiile originare din bazinul Mezoamerica a fost confirmată prezența histidinei și leucinei. În cazul celorlalte opt mutații nonsinonime, au fost semnalate diferențe în și între grupurile din Andean și Mezoamerica (+103, +232, +241, +252, +261 și +262);

Bazinul geografic	Denumire proba	Poziția în cadrul ORF																																																							
		132	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188										
Andean	SVGB-1988	A	A	C	G	T	C	A	A	A	G	A	G	C	A	C	C	C	C	T	T	A	C	G	G	A	A	C	G	G																											
	SVGB-18290					
	SVGB-11642				
	SVGB-14245				
	SVGB-15078			
Mezoamerica	SVGB-7886	C				
	SVGB-8846	C		
	SVGB-3076	C		
	SVGB-2911	C		
	SVGB-45263	C			
	SVGB-9114	C		
	SVGB-5726	C		
	SVGB-5749	C	
	SVGB-2834	C	
	SVGB-5423	C	
	SVGB-11567	C	
	SVGB-5513	C	
	SVGB-14769	C	
	SVGB-3916	C
	SVGB-2087	C
	SVGB-10528	C
	SVGB-11599	C
	SVGB-14022	C
	SVGB-7378	C
	SVGB-5740	C
SVGB-13924	C	
SVGB-16092	C	

Figura 3.7. Alinierea secvențelor nucleotidice ale genei *PvDREB6B*, pentru cele 27 de populații locale de *Phaseolus vulgaris* L., evaluate în cadrul studiului. Variațiile SNP specifice genofondului Andin au fost evidențiate cu portocaliu, iar cele originare din bazinul Mezoamerica au fost marcate cu verde

- pe de altă parte, un aspect deosebit este legat de pattern-ul secvenței nucleotidice al populațiilor SVGB-14245 și SVGB-15078, originare din bazinul Andean și al SVGB-5749 cu origini Mezoamericane. În anumite locusuri (+307, + 309, +478, +564, +669, +672, +694, +702, +723,+781, +791) populațiile cu origini Andine, SVGB-14245 și SVGB-15078, prezintă același tip de mutație punctiformă cu cele din Mezoamerica. Și din nou, populația cu origini Mezoamericane SVGB-5749,

prezintă SNP identice cu cele ale populațiilor originare din bazinul geografic Andean. Acest lucru poate fi explicat, prin faptul că, cele trei populații s-au format prin procesul de hibridizare al populațiilor din cele două regiuni ale Americii și astfel au rezultat hibrizi, ce înglobează trăsături din cadrul celor două genome.

Aranjarea cladistică a probelor studiate, pe baza secvențelor *PvDREB6B* s-a realizat în funcție de originea geografică (Figura 3.8). Au fost generate 2 clade principale, prima fiind divizată în 2 subclade: principala fiind formată din populații originare din bazinul geografic Mezoamerica, iar a doua subcladă conține două populații cu origini Andine. În cea de-a doua grupă, populațiile au fost separate în două subclade, una dintre ele conținând populația SVGB-5749 cu origini Mezoamericane și cea de-a doua subcladă conține trei populații cu origini Andine (SVGB-8290, SVGB-1988, SVGB-11642). Istoria evolutivă a fost realizată prin metoda *Neighbor-Joining*, distanțele genetice au fost determinate prin metoda *Maximum Composite Likelihood*, iar pentru determinarea gradului de confidență a fost aplicat testul statistic Bootstrap (1000 de replicări).

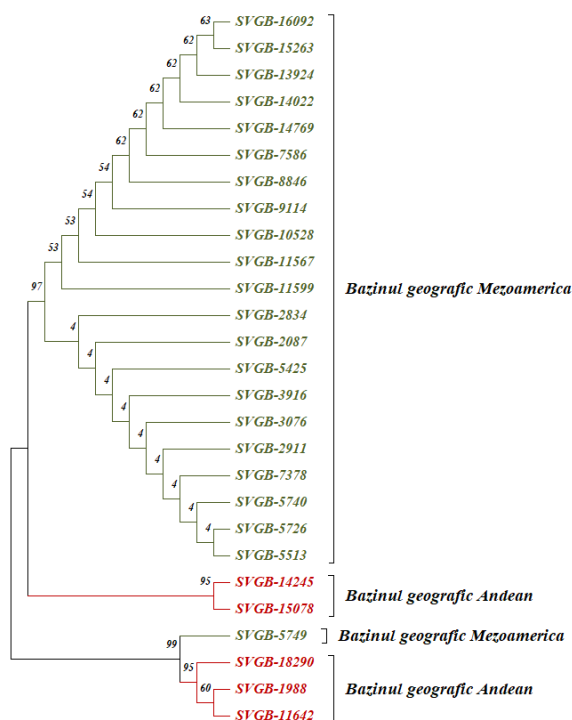


Figura 3.8. Arbore filogenetic- Metoda *Neighbor-Joining* - Secvențele genei *PvDREB6B*. Populațiile marcate cu roșu provin din bazinul geografic Andean, iar cele cu verde din bazinul geografic Mezoamerica

3.6. ANALIZA SECVENȚELOR GENEI *PvRPS4*

Gena *PvRPS4* (*ribosomal protein S4*) codifică o proteină, a cărei concentrație crește atunci când planta se dezvoltă în condiții de stres hidric.

În urma reacției de secvențiere, pentru secvențele codificatoare *PvRPS4*, la locusul +297 a fost identificată prezența timinei pentru o parte din populațiile evaluate, iar în cazul celorlalte populații, a fost sesizată adenina. Prin asocierea acestor date, cu rezultatele anterior obținute (în urma secvențierii regiunii *PvDREB5A*) a fost sesizat faptul că, timina (T) este prezentă la populațiile SVGB-1988, SVGB-18290, SVGB-14245, SVGB-1578, SVGB-11642, cu originea în bazinul geografic Andean. În același locus, populațiile originare din regiunea Mezoamerica, prezintă nucleotida adenină (A). Pe de altă parte, acest SNP identificat este o mutație punctiformă, nonsinonimă ce produce modificarea aminoacidului codificat din secvența proteică. Studiile mai aprofundate, ar putea arăta dacă, această mutație are un efect asupra nivelului de rezistență al plantelor la condițiile mai puțin favorabile de mediu, precum lipsa apei (Figura 3.9).

Bazinul geografic	Denumirea probei	Locusul nucleotidic în ORF			Locusul aa în secvența proteică
		+382	+383	+384	+128
Andean	SVGB-1988	T	T	T	F
	SVGB-18290
	SVGB-11642
	SVGB-14245
	SVGB-1578
	SVGB-15078
Mezoamerica	SVGB-7586	.	.	A	L
	SVGB-8846	.	.	A	L
	SVGB-3076	.	.	A	L
	SVGB-2911	.	.	A	L
	SVGB-15263	.	.	A	L
	SVGB-9114	.	.	A	L
	SVGB-5726	.	.	A	L
	SVGB-5749	.	.	A	L
	SVGB-2834	.	.	A	L
	SVGB-5425	.	.	A	L
	SVGB-11567	.	.	A	L
	SVGB-5513	.	.	A	L
	SVGB-14769	.	.	A	L
	SVGB-3916	.	.	A	L
	SVGB-2087	.	.	A	L
	SVGB-10528	.	.	A	L
	SVGB-11599	.	.	A	L
	SVGB-14022	.	.	A	L
	SVGB-7378	.	.	A	L
	SVGB-5740	.	.	A	L
SVGB-13924	.	.	A	L	
SVGB-16092	.	.	A	L	

Figura 3.9. Aliniere secvențelor nucleotidice ale genei *PvRPS4* și a aminoacizilor din secvența proteică, pentru cele 27 de populații locale de *Phaseolus vulgaris* L., evaluate în cadrul studiului. Modelul nucleotidelor/aminoacizilor din populațiile Andine au fost evidențiate cu portocaliu, iar cele originare din bazinul Mezoamerica au fost marcate cu verde (L- leucină și F- fenilalanină)

Arborele filogenetic al celor 27 de populații de *Phaseolus vulgaris* L., pe baza secvențelor *PvRPS4*, este alcătuit din 2 clade principale, prima fiind formată din populații originare din bazinul geografic Mezoamerica, iar al doilea grup conține cele 5 populații cu origini Andine. Istoria evolutivă a fost determinată prin metoda *Neighbor-Joining*, iar distanțele genetice au fost calculate prin metoda *Maximum Composite Likelihood*, de asemenea, pentru determinarea gradului de confidență a fost aplicat testul statistic Bootstrap (1000 de replicări) (Figura 3.10). Analiza a implicat 27 de secvențe nucleotidice și 398 de poziții în setul final.

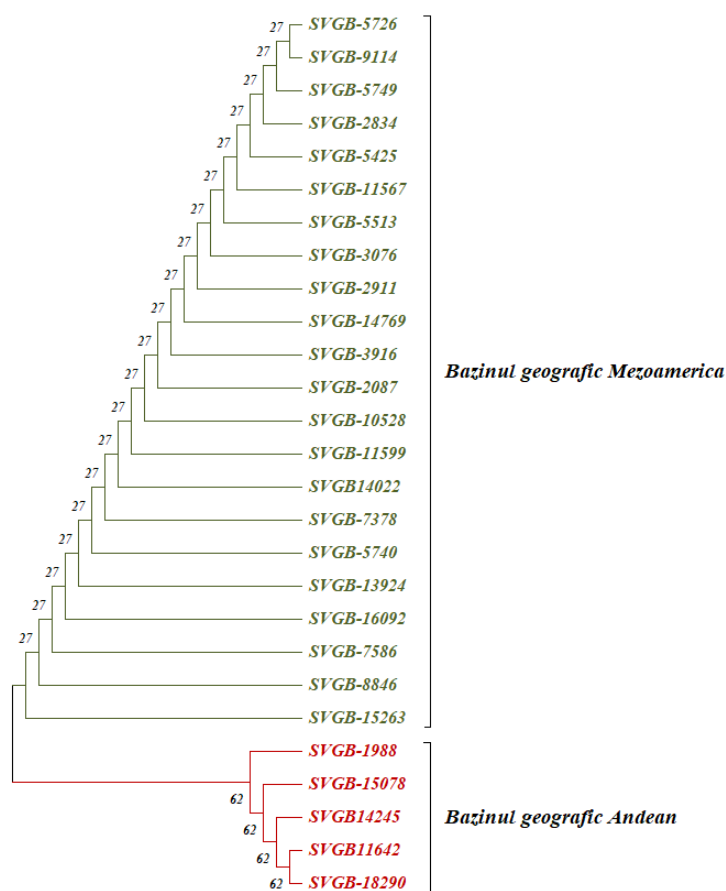


Figura 3.10. Arbore filogenetic- Metoda *Neighbor-Joining* – Secvențele genei *PvRPS4*. Populațiile marcate cu roșu provin din bazinul geografic Andean, iar cele cu verde din bazinul geografic Mezoamerica

3.7. ANALIZA SECVENȚELOR GENEI *PvLEA3*

Secvența *PvLEA3* este o regiune codificatoare de la nivelul genomului nuclear. Datele obținute au permis identificarea unor polimorfisme uninucleotidice în cadrul secvenței codificatoare *PvLEA3*, la specia *Phaseolus vulgaris* L., după cum urmează (Figura 3.11):

- un singur polimorfism uninucleotidic ar permite diferențierea populațiilor originare din Mezoamerica, față de cele din bazinul geografic Andean. Astfel, la locusul +38, probele cu origini Andine prezintă citozina, iar cele din bazinul geografic Mezoamerica prezintă nucleotida timina;
- un alt SNP a fost identificat la locusul +23; adenina este prezentă la populațiile din Andean, dar și în cazul unor probe cu origini Mezoamericane. Prezența timinei este semnalată la locusul +23 pentru 50% dintre populațiile din Mezoamerica;
- alte două polimorfisme identificate au fost pentru locii +847 și +848, doar în cazul populațiilor originare din bazinul geografic Mezoamerica;

Bazinul geografic	Denumirea probei	Locusul nucleotidului în secvența <i>PvLEA3</i>			
		+23	+38	+847	+848
Andean	SVGB-1988	A	C	G	A
	SVGB-18290
	SVGB-11642
	SVGB-14245
	SVGB-15078
Mezoamerica	SVGB-16092	.	T	.	.
	SVGB-15263	.	T	.	.
	SVGB-14769	.	T	.	G
	SVGB-11567	.	T	.	.
	SVGB-13924	.	T	.	.
	SVGB-5740	.	T	.	.
	SVGB-3916	.	T	A	G
	SVGB-2834	.	T	.	.
	SVGB-3076	.	T	.	.
	SVGB-2911	.	T	.	.
	SVGB-2087	.	T	.	G
	SVGB-14022	T	T	.	.
	SVGB-11599	T	T	A	G
	SVGB-10528	T	T	.	.
	SVGB-9114	T	T	.	.
	SVGB-8846	T	T	.	.
	SVGB-7586	T	T	.	.
	SVGB-7378	T	T	.	.
	SVGB-5749	T	T	.	.
	SVGB-5726	T	T	.	.
	SVGB-5513	T	T	.	.
	SVGB-5425	T	T	.	.

Figura 3.11. Alinierea secvențelor nucleotidice ale genei *PvLEA3*, pentru cele 27 de populații locale de *Phaseolus vulgaris* L. Modelul nucleotidelor din populațiile Andine au fost evidențiate cu portocaliu, iar cele originare din bazinul Mezoamerica au fost marcate cu verde

Analiza istoriei evolutive pentru cele 27 de populații de *Phaseolus vulgaris* L., pe baza secvenței *PvLEA3*, a condus la separarea probelor în funcție de originea geografică. Au fost obținute 2 grupuri principale, primul (partea inferioară a arborelui filogenetic) fiind format din populații originare din bazinul geografic Mezoamerica, iar al doilea grup conține 2 subclade cu genotipuri originare din ambele bazine geografice. Istoria evolutivă a fost determinată prin metoda *Neighbor-Joining*, iar distanțele genetice au fost calculate prin

metoda *Maximum Composite Likelihood*, de asemenea pentru determinarea gradului de confidență a fost aplicat testul statistic Bootstrap (1000 de replicări) (Figura 3.12).

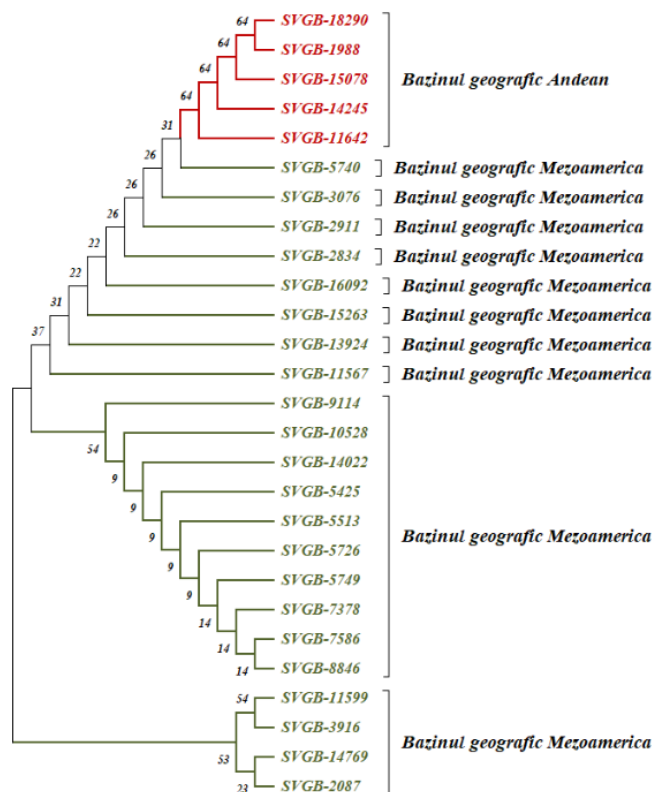


Figura 3.12. Arbore filogenetic- Metoda *Neighbor-Joining* – Secvențele genei *PvLEA3*, populațiile marcate cu roșu provin din bazinul geografic Andean, iar cele cu verde din bazinul geografic Mezoamerica

3.8. ANALIZA SPAȚIULUI INTERGENIC *rpoC1-rpoC2*

Spațiul intergenic *rpoC1-rpoC2* este prezent la nivelul genomului cloroplastic și este flancat de genele *rpoC1* și *rpoC2*. În urma reacției Sanger, au fost evidențiate următoarele:

- lungimea finală a fragmentului secvențiat este de 930 perechi de baze;
- au fost identificate șapte polimorfisme uninucleotidice la nivelul regiunii *rpoC1-rpoC2* (Figura 3.13);
- șase din totalul SNP permit identificarea populațiilor cu origini geografice diferite.

Bazinul geografic	Denumirea probei	Locusul nucleotidelor în secvența <i>rpoC1-rpoC2</i>						
		-1211	-1212	-1213	-1214	-1348	-1406	-1444
Andean	SVGB-1988	A	T	A	T	T	A	C
	SVGB-18290
	SVGB-11642	C	.	.
	SVGB-14245
	SVGB-15078
	SVGB-16092	T	A	T	A	.	T	T
Mezoamerica	SVGB-15263	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-14769	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-11567	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-13924	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-5740	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-3916	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-2834	T	A	T	A	C	T	T
	SVGB-3076	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-2911	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-2087	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-14022	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-11599	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-10528	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-9114	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-8846	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-7586	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-7378	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-5749	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-5726	T	A	T	A	.	T	T
	SVGB-5513	T	A	T	A	.	T	T
SVGB-5425	T	A	T	A	.	T	T	

Figura 3.13. Analiza secvențelor nucleotidice, pentru spațiul intergenic *rpoC1-rpoC2*, pentru cele 27 de populații locale de *Phaseolus vulgaris* L. SNP Andin au fost evidențiate cu portocaliu, iar cele originare din bazinul Mezoamerica sunt marcate cu verde

Genotipurile evaluate au fost separate în funcție de originea geografică într-un arbore filogenetic, astfel s-au obținut 2 grupuri principale. Istoria evolutivă a fost determinată prin metoda *Neighbor-Joining*, iar distanțele genetice au fost calculate prin metoda *Maximum Composite Likelihood*, iar pentru determinarea gradului de confidență a fost aplicat testul statistic Bootstrap (1000 de replicări) (Figura 3.14).

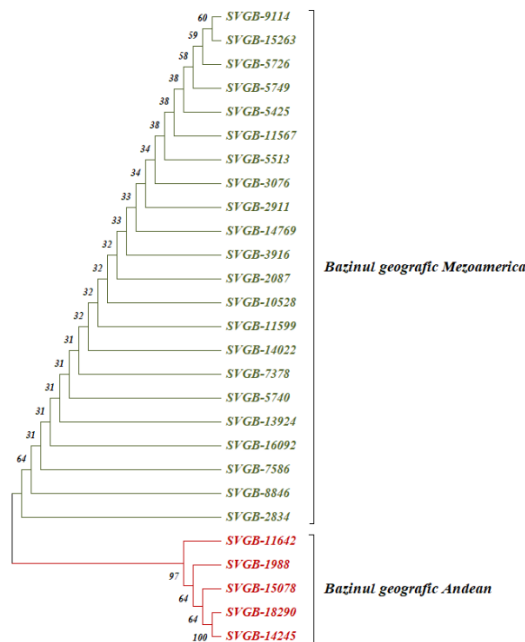


Figura 3.14. Arbore filogenetic- Metoda *Neighbor-Joining* – Secvențele spațiului intergenic *rpoC1-rpoC2*, populațiile marcate cu roșu provin din bazinul geografic Andean, iar cele cu verde din bazinul geografic Mezoamerica

3.9. ANALIZA SPAȚIULUI INTERGENIC *trnL-trnT*

Secvența necodificatoare *trnL-trnT* este un spațiu intergenic din genomul cloroplastic, flancat de genele *trnL* și respectiv *trnT*. În urma reacției de secvențiere Sanger au fost identificate 3 polimorfisme uninucleotidice; la locusul +78, populațiile din bazinul geografic Andean, au raportat prezența adeninei, iar la același locus, în cazul populațiilor din regiunea centrală a Americii a fost semnalată prezența timinei. Cel de-al doilea polimorfism uninucleotidic identificat, în secvența necodificatoare *trnL-trnT* este la locusul +79, iar al treilea polimorfism uninucleotidic evidențiat este la locusul +136 și nu permite diferențierea populațiilor de *Phaseolus vulgaris* L. în funcție de originea geografică (Figura 3.15).

Bazinul geografic	Denumirea probei	Locusul nucleotidei în secvența <i>trnL-trnT</i>		
		+78	+79	+136
Andean	SVGB-1988	A	T	A
	SVGB-18290	.	.	.
	SVGB-11642	.	.	.
	SVGB-14245	.	.	.
	SVGB-15078	.	.	.
Mezoamerica	SVGB-16092	T	A	.
	SVGB-15263	T	A	.
	SVGB-14769	T	A	.
	SVGB-11567	T	A	.
	SVGB-13924	T	A	.
	SVGB-5740	T	A	.
	SVGB-3916	T	A	.
	SVGB-2834	T	A	.
	SVGB-3076	T	A	C
	SVGB-2911	T	A	.
	SVGB-2087	T	A	C
	SVGB-14022	T	A	.
	SVGB-11599	T	A	.
	SVGB-10528	T	A	.
	SVGB-9114	T	A	.
	SVGB-8846	T	A	.
	SVGB-7586	T	A	.
	SVGB-7378	T	A	C
	SVGB-5749	T	A	.
	SVGB-5726	T	A	.
SVGB-5513	T	A	.	
SVGB-5425	T	A	.	

Figura 3.15. Alinierea secvențelor nucleotidice, ale spațiului intergenic *trnL-trnT*, pentru cele 27 de populații locale de *Phaseolus vulgaris* L. SNP Andine au fost evidențiate cu portocaliu, iar cele originare din bazinul Mezoamerica sunt marcate cu verde

Istoria evolutivă a celor 27 de genotipuri ce aparțin speciei *Phaseolus vulgaris* L., poate fi dedusă și prin analiza arborilor filogenetici. Populațiile evaluate au fost separate în funcție de originea geografică a acestora, în două grupuri principale, grupul originar din Andean și cel din Mezoamerica. Istoria evolutivă a fost determinată prin metoda *Neighbor-Joining*, iar distanțele genetice au fost calculate prin metoda *Maximum Composite*

Likelihood, iar pentru determinarea gradului de confidență a fost aplicat testul statistic Bootstrap (1000 de replicări) (Figura 3.16).

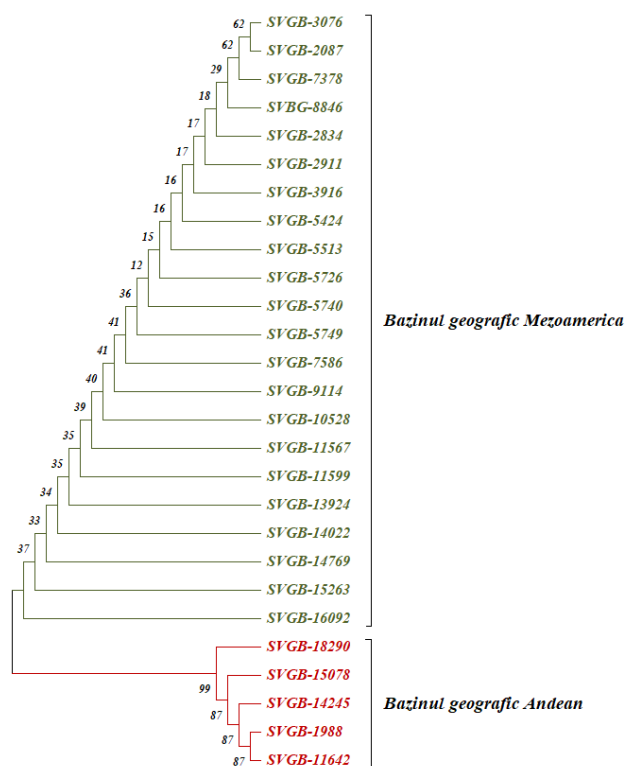


Figura 3.16. Arbore filogenetic- Metoda *Neighbor-Joining* – Secvențele spațiului intergenic *trnL-trnT*, populațiile marcate cu roșu provin din bazinul geografic Andean, iar cele cu verde din bazinul geografic Mezoamerica

3.10. ANALIZA FILOGEOGRAFICĂ A SPECIEI *PHASEOLUS VULGARIS* L. CU AJUTORUL UNOR PARAMETRII MORFOLOGICI

În urma cântării M100 semințe, pentru fiecare dintre cele 27 de populații, au fost obținute următoarele:

- 29,62% dintre populații sunt reprezentate de semințe mari (masa a 100 semințe > 40 g);
- 62,96% sunt considerate semințe medii (greutatea a 100 de semințe, variază între 25-40 g);
- 7,40% dintre populațiile analizate au semințele mici (masa a 100 de semințe < 25 g).

Dacă apartenența la o zonă geografică s-ar realiza doar pe baza aprecierilor morfologice, probele SVGB-18290 (M100 = 22,95 g), SVGB-3076 (M100 = 24,21 g) ar fi

originare din Mezoamerica (7,40% din populațiile analizate ar prezenta origini Mezoamericane), iar 92,30% dintre populații ar avea origini Andine (25 de populații din cele 27 studiate). Stabilirea apartenenței probelor de *Phaseolus vulgaris* L., la o anumită regiune geografică se poate realiza și prin aprecierea formei semințelor, astfel cele cu formă cubică (SVGB-16092) și reniformă (SVGB-11642), sunt caracteristice regiunii geografice Mezoamerica. Doar pe baza acestor caracteristici, nu se pot face afirmații pertinente cu privire la originea geografică a populațiilor de *Phaseolus vulgaris* L. Însă studiile realizate la nivel molecular, prin secvențierea unor regiuni specifice, pot afirma sau infirma rezultatele de la nivel morfologic. Pe baza parametrilor morfologici ai germoplasmei vegetale s-au identificat diferențe între cele două grupuri (Andean/Mezoamerica) (Tabel 3.1).

Tabelul 3.1. Valori medii ale unor parametrii morfologici, pentru cele două grupuri de *Phaseolus vulgaris* L.

Caracteristica	Intervalul (Min-Max)	Media ± SD	Eroarea standard a mediei	Coefficientul de variație
Bazinul geografic Andean				
Lungime (mm)	5.19 (11.61 - 16.8)	14.04 ± 2.25	1.01	16.09%
Lățime (mm)	0.96 (4.55 - 5.51)	509 ± 0.36	0.16	7.25%
Înălțime (mm)	2.57 (5.66 - 8.23)	7.09 ± 1.2	0.54	17.03%
Greutate (mm)	0.33 (0.23 - 0.56)	0.38 ± 0.14	0.06	36.53%
Indicele de planeitate	0.19 (1.26 - 1.45)	1.36 ± 0.06	0.03	5.01%
Indicele de excentricitate	1.33 (1.84 - 3.17)	2.58 ± 0.53	0.23	20.60%
Masa a 100 de semințe(g)	27.52 (22.95 - 50.48)	37.74 ± 10.32	4.61	27.35%
Bazinul geografic Mezoamerica				
Lungime (mm)	5.94 (9.86 – 15.8)	12.42 ± 1.9	0.4	15.29%
Lățime (mm)	2.15 (4.39 – 6.54)	5.26 ± 0.61	0.13	11.61%
Înălțime (mm)	4.16 (6.56 – 10.72)	7.83 ± 1	0.21	12.81%
Greutate (mm)	1.71 (0.24 – 1.95)	0.43 ± 0.35	0.07	80.09%
Indicele de planeitate	0.24 (1.05 – 1.29)	1.15 ± 0.06	0.01	5.49%
Indicele de excentricitate	2.12 (1.27 – 3.39)	2.3 ± 0.61	0.13	26.73%
Masa a 100 de semințe(g)	36.79 (24.21 – 61)	34.44 ± 9.19	1.96	26.69%

3.11. EVALUAREA MORFOLOGICĂ A PLANTELOR SPECIEI *PHASEOLUS VULGARIS* L. DEZVOLTATE ÎN CONDIȚII DE SECETĂ

Perioadele de secetă obligă organismele vegetale să adopte diferite măsuri, care pot reduce pierderile de apă, iar acest lucru se manifestă și prin modificări apărute la nivelul țesuturilor, precum cel foliar și radicular. Un exemplu în acest sens, îl reprezintă *mișcarea* frunzelor. Fenomenul de rolare al frunzelor este foarte des întâlnit la *Phaseolus vulgaris* L. și reprezintă un mecanism de adaptare al speciei în fața stresului (Kadioglu et al., 2012; Lizana et al., 2006; Pastenes et al., 2005). În cazul de față a fost observat fenomenul de rolare la frunze și mișcarea paraheliotrofă (gruparea frunzelor trifoliolate) (Figura 3.18).

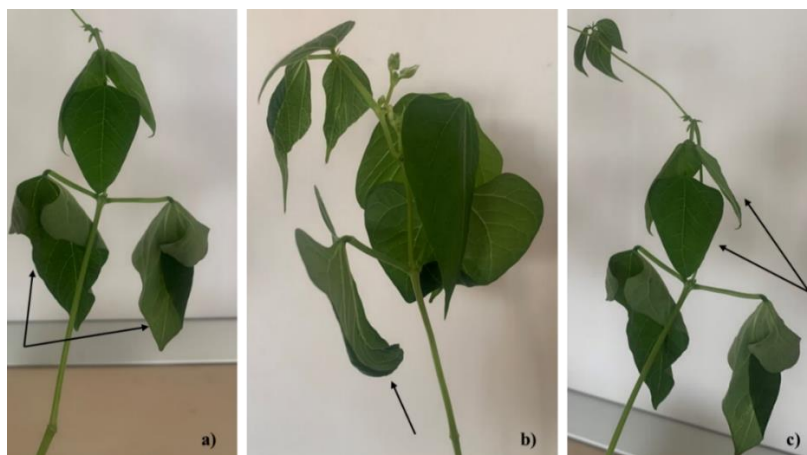


Figura 3.18. Imagini surprinse în diferite etape ale experimentului, prezentând modificările apărute la nivelul țesutului foliar: a) evidențierea fenomenului de senescență surprins la frunzele din etajul inferior al plantei, varietatea SVGB-2087, după 12 zile de stres hidric; b) surprinderea efectului de rolare, la varietate SVGB-1988, după 12 zile de secetă; c) surprinderea fenomenului de grupare al primului etaj de frunze trifoliolate la varietatea SVGB-2087, după 12 zile de secetă

Analiza morfologică a plantelor varietății SVGB-1988 (originare din bazinul geografic Andean) a evidențiat prezența florilor, atât în cazul plantelor irigate, cât și în cazul celor neirigate timp de 8 și 12 zile (Figura 3.19). Acesta este un fenomen clasic de adaptare la lipsa apei, denumit “evadarea din secetă”, planta își canalizează toată energia și toți nutrienții pentru finalizarea ciclului celular, permițând dezvoltarea florii și ulterior a fructului (Fang & Xiong, 2015; Shavrukov et al., 2017).



Figura 3.19. Studiul fenotipic al varietății SVGB-1988 (Andean): a) lotul martor, irigat de 30 de zile; b) lotul stresat hidric, 8 zile; c) lotul martor, irigat de 34 de zile; d) lotul stresat hidric, 12 zile

În cazul populației locale SVGB-2087 a fost notată o dezvoltare mai puțin accentuată a indivizilor din lotul stresat hidric timp de 8 și respectiv 12 zile, comparativ cu indivizii irigați pe toată perioada experimentului (Figura 3.20).



Figura 3.20. Studiul fenotipic al varietății SVGB-2087 (Mezoamerica): a) lotul martor, irigat 30 de zile; b) lotul stresat hidric, 8 zile; c) lotul martor irigat, 34 de zile; d) lotul stresat hidric, 12 zile

Deși varietatea Lechința este cunoscută ca având o rezistență crescută la secetă, prin simpla analiză morfologică a plantelor se poate observa o slabă dezvoltare a indivizilor neirigați comparativ cu cei din loturile martor (Figura 3.21), unde este dezvoltată și floarea, iar numărul frunzelor trifoliolate este mult mai mare.

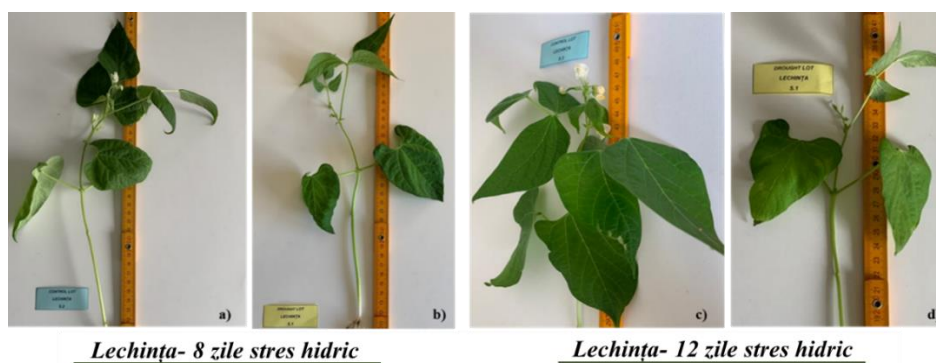


Figura 3.21. Studiul fenotipic al varietății Lechința: a) lotul martor, irigat 30 de zile; b) lotul stresat hidric, 8 zile; c) lotul martor, irigat 34 de zile; d) lotul stresat hidric, 12 zile

În urma determinării unor parametrii fenotipici, pentru indivizii celor trei populații, au fost observate diferențe între loturile irigate și neirigate, mai mari pentru populația locală, originară din bazinul geografic Mezoamerica, SVGB-2087 și mai mici pentru populația cu origini Andine, SVGB-1988 (Figura 3.22).

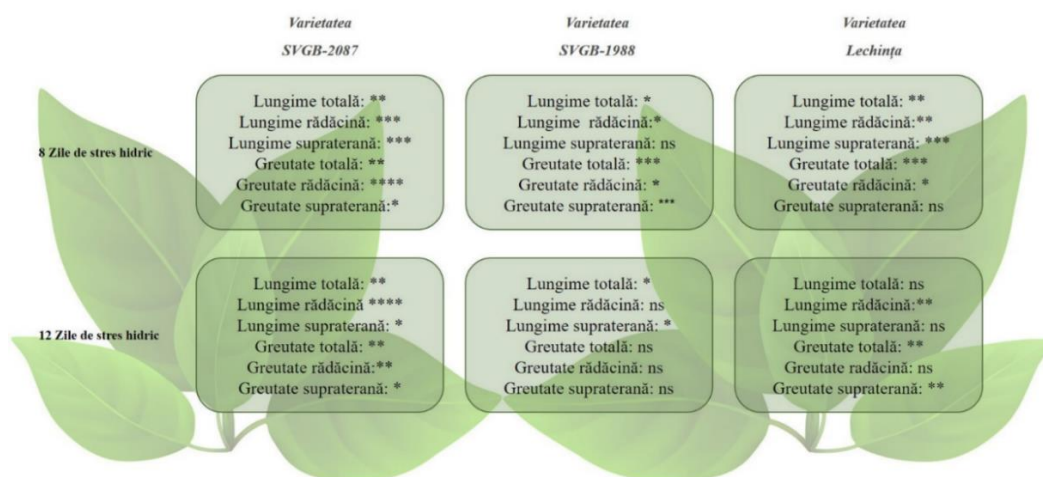


Figura 3.22. Schematizarea diferențelor obținute între loturile irigate și neirigate ale celor 3 varietăți ale speciei *Phaseolus vulgaris* L., în urma determinării unor parametrii morfologici și evidențierea semnificației statistice

3.12. EVALUAREA PREPARATELOR MORFOANATOMICE, ALE VARIANTELOR SPECIEI *PHASEOLUS VULGARIS* L., DEZVOLTATE ÎN DIFERITE CONDIȚII DE MEDIU

Modificările fenotipice, generate de stresul hidric, sunt rezultatul unor modificări profunde fiziologie și metabolice. Astfel, studiul morfoanatomic al țesuturilor vegetale poate oferi informații valoroase cu privire la gradul de rezistență al varietăților de *Phaseolus vulgaris* L. la factorul de stres hidric. Evaluările morfoanatomice pot fi utilizate ca markeri de identificare pentru genotipurile cu însușiri superioare de rezistență la secetă.

3.12.1. Analiza secțiunilor morfoanatomice pentru varietatea SVGB-2087

În secțiune transversală, la nivelul hipocotilului au fost identificate o serie de diferențe (Figura 3.23). Deosebiriile dintre cele două variante (irigat și stresat hidric 8 zile) sunt de ordinul celor cantitative. Pentru individul irigat au fost constatate mai multe elemente de liber secundar (marcat cu săgețile galbene), în timp ce la varietatea neirigată procesul de histogeneză a țesuturilor conducătoare stagnează, motivul presupus fiind lipsa apei.

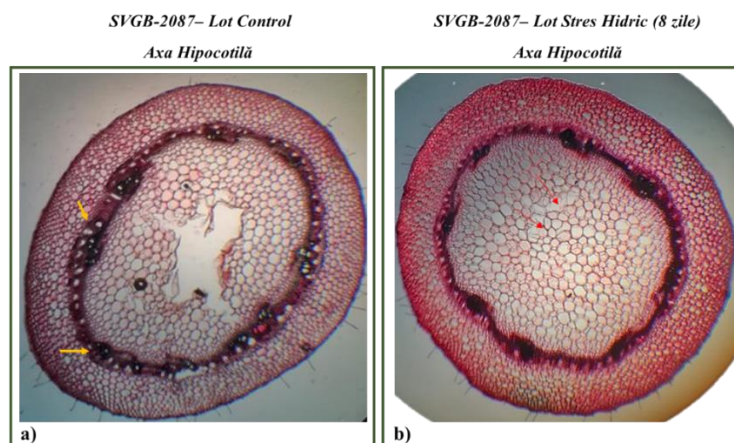


Figura 3.23. Secțiuni transversale prin axa hipocotilă: a) SVGB-2087, lot control (x20); b) SVGB-2087, lot stres hidric 8 zile (x20)

De asemenea, diferențe între indivizii irigați și stresați hidric au fost observate și în secțiunile transversale din axa epicotilului (Figura 3.24). Conturul secțiunii transversale este asemănător, în cazul indivizilor irigați și stresați hidric, hexagonal-neregulat, cu 6 creste ce alternează cu 6 valecule. Țesuturile conducătoare sunt organizate în principal sub forma fasciculelor libero-lemnoase primare, de tip colateral deschis, dispuse pe un cerc (20-24 fascicule). Vasele de lemn din fasciculele lotului control sunt vizibil mai mari decât cele ale fasciculelor lotului neirigat (marcat cu săgețile galbene); dimensiunea lor este corelată cu fluxul de sevă brută.

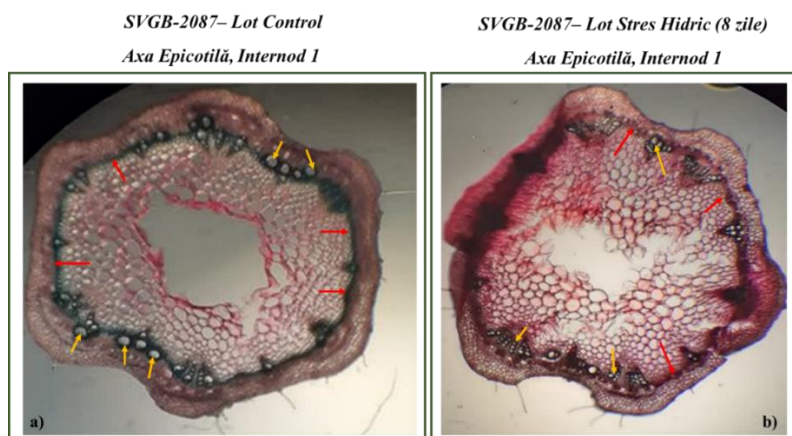


Figura 3.24. Secțiuni transversale prin axa epicotilă: a) SVGB-2087, lot control (x20); b) SVGB-2087, lot stres hidric 8 zile (x20)

În secțiune transversală prin axa hipocotilului, în cazul variantei SVGB-2087, au fost observate diferențe între lotul martor și cel stresat hidric 12 zile. Astfel, cambiul interfascicular este în curs de formare, nu este activ, nu generează nimic; structura este mai tânără decât cea de la lotul stresat hidric, deși planta este mai bine dezvoltată din punct de

vedere morfologic. Cambiul interfascicular este foarte activ, iar structura cilindrului central este mai avansată din punct de vedere histologic decât cea a lotului control, deși planta este mai puțin dezvoltată din punct de vedere morfologic (Figura 3.24).

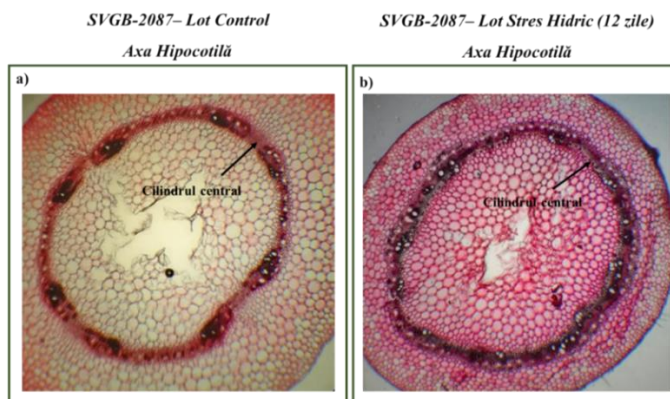


Figura 3.24. Secțiuni transversale prin axa hipocotilă: a) SVGB-2087, lot control (x20); b) SVGB-2087, lot stres hidric, 12 zile (x20)

Un fenomen deosebit (Figura 3.25) care poate fi corelat cu stresul hidric îl reprezintă reacția de răspuns a plantei manifestată prin generarea de rădăcini adventive, de origine endogenă. Chiar dacă se poate presupune obiectiv, că în lipsa apei planta nu are de ce să-și dezvolte sistemul radicular, acest aspect este valabil pentru ceea ce crește în sol; în schimb, de pe hipocotilul aerian, adventiv, pot apărea rădăcini, ca o strategie activă de identificare a unor posibile resurse de apă.

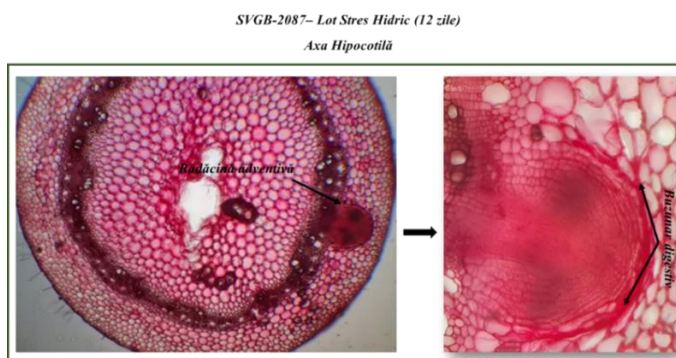


Figura 3.25. Secțiuni transversale prin axa hipocotilă: SVGB-2087, stânga imaginii: lot stres hidric, 12 zile; formarea unei rădăcini adventive (x20); dreapta imaginii: lot stres hidric, 12 zile; formarea unei rădăcini adventive (x200)

În secțiunea transversală prin axa epicotilă au fost observate o serie de diferențe între proba irigată (34 zile) și cea stresată hidric (12 zile) (Figura 3.26). Cambiul interfascicular este mai activ la lotul stresat hidric, generând spre exterior elemente liber secundare, iar spre interior libriform. Ca dezvoltare, lotul stresat hidric are axa epicotilă mai avansată din punct

de vedere histologic (este ca și cum s-ar grăbi cu edificarea părții vegetative pentru a avea timp și pentru formarea florii, fructului, semințelor). Genotipul SVGB-2087 indică prin comportamentul structural al variantelor stresate hidric că are potențial de rezistență prin răspunsuri structurale și morfologice caracteristice.

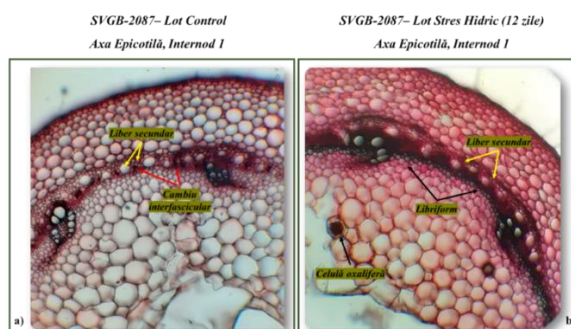


Figura 3.26. Secțiuni transversale prin axa epicotilă: a) SVGB-2087, lot control (x100); b) SVGB-2087, lot stres hidric, 12 zile (x100)

3.12.2. Analiza secțiunilor morfoanatomice pentru varietatea SVGB-1988

A fost constatată dezvoltarea unor rădăcini adventive, atât în cazul probei irigate, cât și în cazul celei stresate hidric, ce au rolul de a contribui la îmbunătățirea stării de hidratare a plantei (Figura 3.27). Geneza rădăcinilor adventive își are originea în cambiul interfascicular cu participarea elementelor de liber secundar și a celor periciclice.

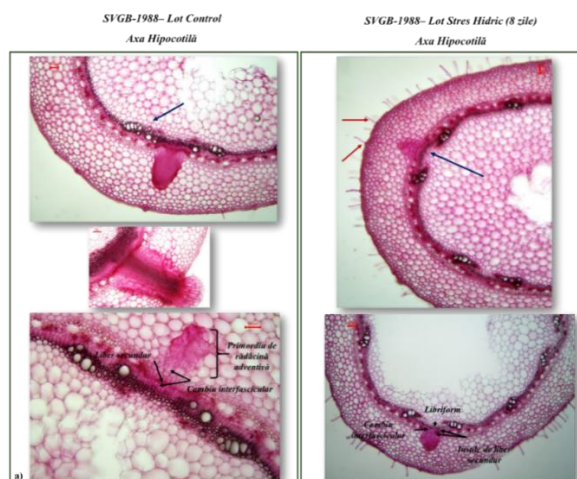


Figura 3.27. Secțiuni transversale prin axa hipocotilă: a) SVGB-1988, lot martor (x20, x100); b) SVGB-1988, lot stres hidric, 8 zile (x20, x100)

În secțiunea transversală a epicotilului a fost observată o dispunere diferită a fasciculelor libero-lemnoase, pentru varianta irigată și cea neirigată. Astfel, pentru genotipul irigat timp de 30 de zile, fasciculele libero-lemnoase inițiale primare, heteromorfe, prezintă

o dispoziție a vaselor de lemn în mod uniseriat. În schimb, la varietatea neirigată, timp de 8 zile, fasciculul libero-lemnos inițial, primar are o dispoziție a vaselor de lemn în forma literei V (Figura 3.28).

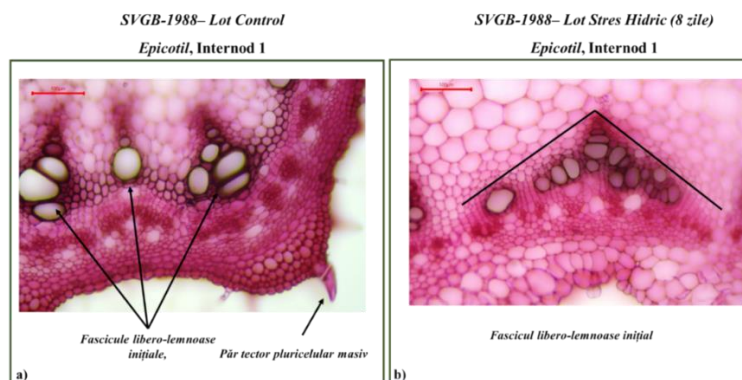


Figura 3.28. Secțiuni transversale prin axa epicotilă: a) SVGB-1988, lot control (x100); b) SVGB-1988, lot stres hidric, 8 zile (x100)

În secțiune transversală, preparatele morfoanatomice au prezentat numeroase deosebiri, între variantele irigate și cele neirigate, la nivelul hipocotilului (Figura 3.29). În cazul genotipului SVGB-1988 irigat, a fost observată tendința de dezorganizare a celulelor din scoarța parenchimatice. Acest fenomen a fost determinat de acumularea de țesuturi suplimentare din interior, produse de cambiul interfascicular și cambiul intrafascicular. În cazul genotipului neirigat au fost evidențiate în Figura 3.29 b) aspecte diferite, comparativ cu cele ale lotului control. Săgețile albastre marchează celule din cortexul parenchimului aflate în dezorganizare, pe când cele galbene reprezintă elemente ale periciclului sclerenchimos nelignificat.

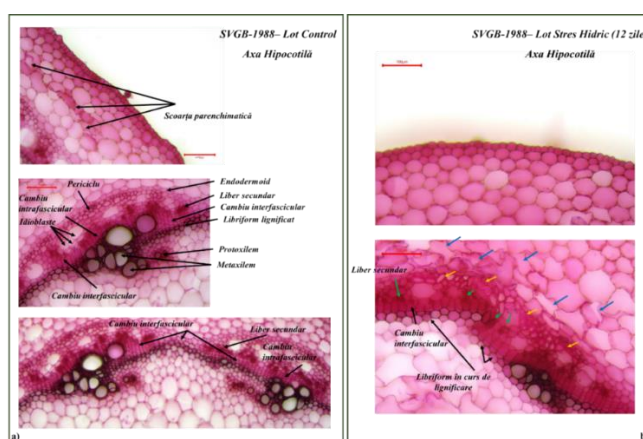


Figura 3.29. Secțiuni transversale prin axa hipocotilă: a) SVGB-1988, lot control (x100, x200); b) SVGB-1988, lot stres hidric, 12 zile (x100, x200)

Diferențe au fost sesizate și la nivelul epicotilului pentru cele două variante ale genotipului SVGB-1988 (Figura 3.30). La varianta control, săgețile verzi (a și b) indică

formarea unor vase de lemn secundar de către cambiul intrafascicular, aflate în imediata vecinătate a vasului de metaxilem din lemnul primar. În rest, cambiul interfascicular este cel mai activ producând spre exterior insule de liber secundar și idioblaste secretoare, iar spre interior, libriform lignificat. La varianta stresată hidric (d) săgeata verde indică formarea de către cambiul intrafascicular, a unor vase de lemn secundar, aflate în prelungirea ultimului vas mare de metaxilem, vase ușor aplatizate și cu pereții ușor îngroșați dar nelignificați. Pe alocuri (săgeata albastră) apar vase de lemn secundar produse de cambiul interfascicular, alături de libriform lignificat. Prin cele prezentate mai sus, putem afirma că, genotipul SVGB-1988 răspunde foarte bine la stresul hidric.

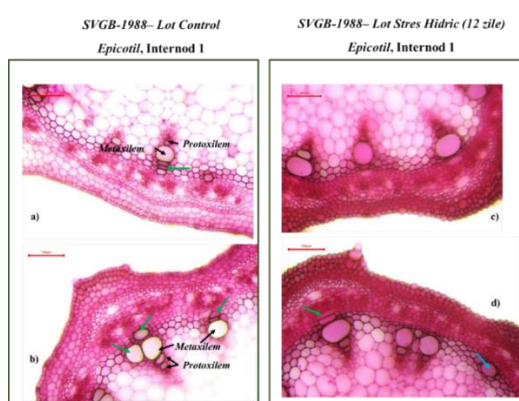


Figura 3.30. Secțiuni transversale prin axa epicotilului: a) SVGB-1988, lot control (x100); b) SVGB-1988, lot stres hidric, 12 zile (x100)

3.12.3. Analiza secțiunilor morfoanatomice pentru varietatea Lechința

În cazul variantei neirigate timp de 8 zile au fost raportate diferențe și aspecte care sugerează că, genotipul Lechința este rezistent la secetă, prin numeroasele mecanisme de adaptare pe care le realizează. În Figura 3.31 a), cambiul interfascicular este deosebit de activ în procesul de traheogeneză, chiar dacă este vorba despre stres hidric. Se poate considera ca fiind o particularitate aparte a genotipului Lechința, care reacționează bine la stres hidric. Cavitatea aeriferă centrală este mai mică, practic, celulele sunt păstrate ca sursă de apă (cu localizare vacuolară).

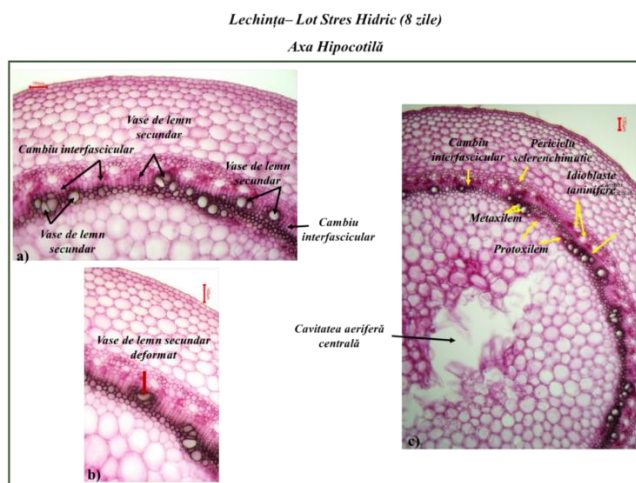


Figura 3.31. Secțiuni transversale prin axa hipocotilă: a) Lechința, lot stres hidric 8 zile, (x100); b) Lechința, lot stres hidric 8 zile, (x100); c) Lechința, lot stres hidric 8 zile (x100);

Secțiunile prin structura epicotilului au permis evidențierea unor aspecte în cazul varinței irigate și neirigate (Figura 3.32). Conturul secțiunii transversale este circular-oval la varianta control și circular-costat la varianta stresată hidric. De asemenea, genotipul neirigat prezintă la nivelul epidermei peri tectori foarte lungi, pluricelulari; la varianta control aceștia sunt mai rari. Numărul de idioblaste secretoare este mult mai redus la varianta stresată hidric decât la control. Măduva se dezorganizează la ambele variante, aproape la fel de puternic și intens.



Figura 3.32. Secțiuni transversale prin axa epicotilului: a) Lechința, lot control, (x20); b) Lechința, lot stres hidric, 8 zile, (x20)

În Figura 3.33 săgețile negre evidențiază diferența existentă între libriformul produs de cambiul interfascicular de la varianta control și cea stresată hidric: un libriform

pluristratificat, intens lignificat la varianta control și un libriform uni-bistratificat, slab lignificat la varianta stresată hidric.

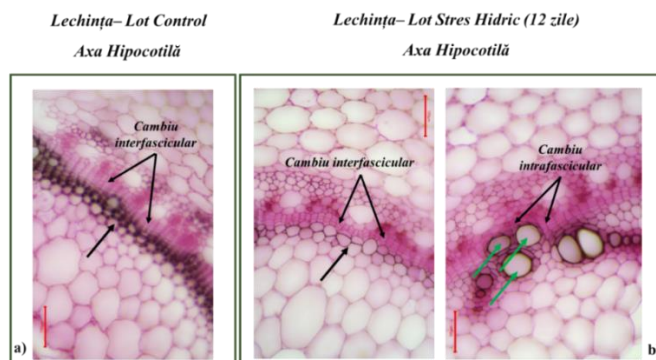


Figura 3.33. Secțiuni transversale prin axa hipocotilă: a) Lechința, lot control (x200); b) Lechința, lot stres hidric, 12 zile (x200)

În Figura 3.34 săgețile roșii indică zona de cambiu interfascicular care este foarte slab reprezentată și care se diferențiază aproape în totalitate spre exterior în liber secundar. Fasciculele conducătoare sunt în totalitate cu structură primară, așa cum au fost generate de procambiu având vase de lemn (protoxilem și metaxilem) și celule de parenchim lemnos cu pereții subțiri celulozo-pectici.

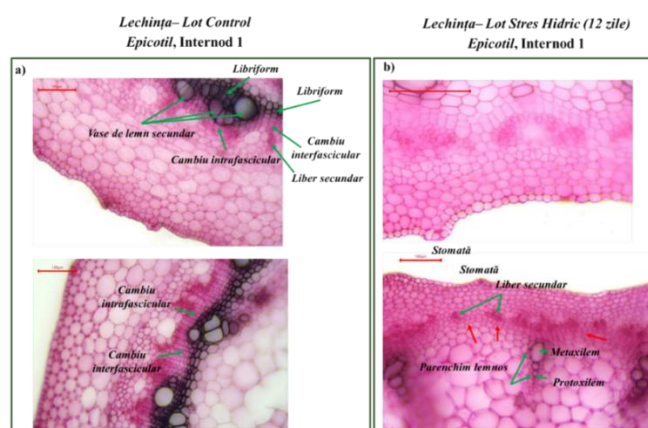


Figura 3.34. Secțiuni transversale prin axa epicotilului: a) Lechința, lot control; b) Lechința, lot stres hidric, 12 zile (x100)

3.13. EVALUAREA PIGMENȚILOR ASIMILATORI AI PLANTELOR SPECIEI *PHASEOLUS VULGARIS* L. DEZVOLTATE ÎN CONDIȚII DE SECETĂ

Atunci când plantele nu au un aport suficient de apă, acestea vor suferi o serie de modificări, nu doar la nivel morfologic, ci și la nivel biochimic. În această categorie pot fi incluse, modificările apărute în timpul proceselor de fotosinteză, modificări ale concentrației unor substanțe implicate în mecanismele de reglare osmotică, precum și ale unor enzime

antioxidante și ale fitohormonilor. În acest caz a fost determinată concentrația clorofilei *a*, clorofilei *b* și a carotenoidelor din țesutul foliar al celor trei genotipuri. Datele au arătat că cele mai mari diferențe între loturile experimentale au fost raportate pentru populația locală originară din bazinul geografic Mezoamerica, SVGB-2087, iar cele mai mici diferențe, în cazul genotipului Lechința (Figura 3.35).

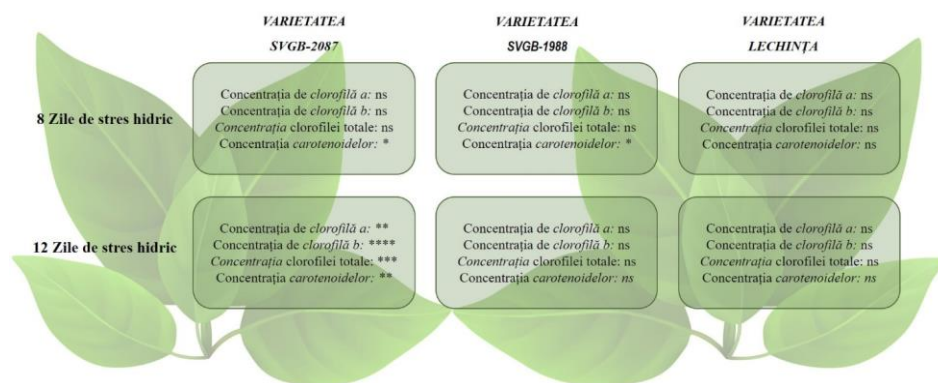


Figura 3.35. Shematizarea diferențelor obținute între loturile irigate și neirigate ale celor 3 varietăți *Phaseolus vulgaris* L., în urma determinării unor parametrii biochimici și evidențierea semnificației statistice

3.14. EVALUAREA UNOR PARAMETRII FIZIOLOGICI AI PLANTELOR SPECIEI *PHASEOLUS VULGARIS* L. DEZVOLTATE ÎN CONDIȚII DE SECETĂ

Determinarea unor parametrii fiziologici ai plantei, precum conținutul relativ al apei (RWC) și rata creșterii relative, poate fi exploatată în vederea identificării varietetelor speciei *Phaseolus vulgaris* L. cu rezistență crescută la factorul de stres hidric. Rezultatele obținute în acest studiu au fost diferite în funcție de varietatea evaluată, dar și în funcție de intensitatea stimulului aplicat (Figura 3.36).

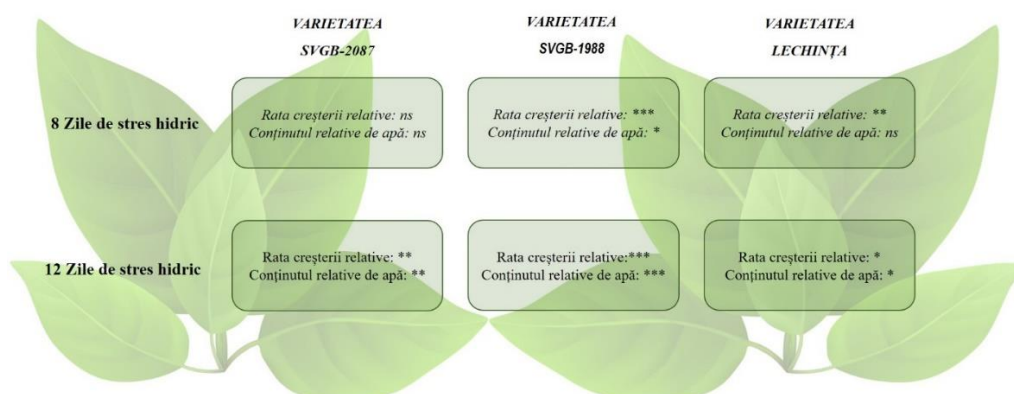


Figura 3.36. Shematizarea diferențelor obținute între loturile irigate și neirigate ale celor 3 varietăți *Phaseolus vulgaris* L., în urma determinării unor parametrii fiziologici și evidențierea semnificației statistice

3.15. EVALUAREA EXPRESIEI UNOR GENE IMPLICATE ÎN RĂSPUNSUL PLANTELOR SPECIEI *PHASEOLUS VULGARIS* L. LA CONDIȚII DE SECETĂ

În cazul studiului de față a fost analizată expresia a 14 gene, din care 13 sunt implicate în creșterea și dezvoltarea, dar și în răspunsul la stresul hidric al speciei *Phaseolus vulgaris* L. și a unei gene de referință (housekeeping): *PvABA'8H*, *PvDREB1*, *PvDREB2*, *PvDREB6B*, *PvERF*, *PvLEA3*, *PvMYB03*, *PvMYB07*, *PvMYC*, *PvP5CS10*, *PvPP2C-12*, *PvWRKY 53*, *PvWRKY 57* și *PvACT* (housekeeping).

3.15.1. Analiza expresiei unor gene funcționale implicate în răspunsul la secetă

Genele implicate în răspunsul la stresul hidric sunt clasificate în două categorii: gene funcționale și gene reglatorii. În prima categorie sunt incluse genele al căror produs de sinteză este implicat direct în răspunsul față de stres.

3.15.1.1. Expresia relativă a genei *PvLEA3*

După o perioadă de 8 zile de stres hidric, au fost raportate diferențe între loturile experimentale, astfel gena *PvLEA3* a fost mai intens exprimată la nivelul țesutului radicular, comparativ cu cel foliar, pentru toate variantele studiate. Prin expunerea plantelor la 12 zile de stres hidric, au fost observate valori superioare ale expresiei genei *PvLEA3* în frunză, pentru varietatea SVGB-2087 și în rădăcină, pentru genotipul Lechința. În țesutul radicular a fost înregistrată o scădere a expresiei genei *PvLEA3* pentru populația SVGB-2087, după 12 zile de secetă (Figura 3.36).

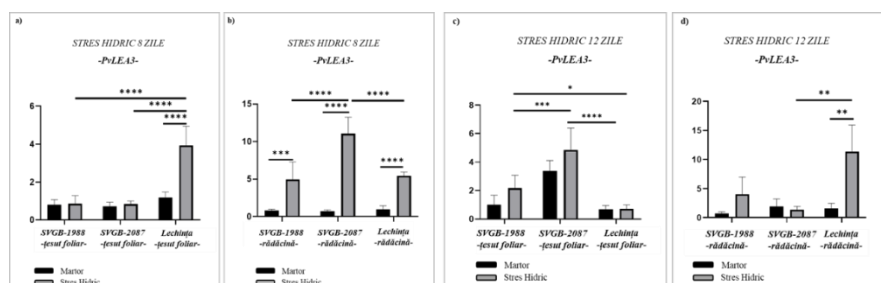


Figura 3.36. Expresia relativă a genei *PvLEA3*, după 8 și 12 zile de de secetă- pentru varietățile SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular.

Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicare biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.1.2. Expresia relativă a genei *PvP5CS10*

$\Delta 1$ -Pyrroline-5-carboxylate synthase sau *P5CS10* este o genă funcțională controlată de calea ABA-dependent, iar expresia sa crește în condiții de stres abiotic. După 8 zile de secetă au fost înregistrate valori superioare ale expresiei genei *PvP5CS10* atât în țesutul foliar, cât și cel radicular pentru genotipul SVGB-2087. Pe de altă parte, cele 12 zile de stres hidric au permis înregistrarea unor valori diferite ale expresiei, mai mari în frunză pentru populația SVGB-2087 și pentru genotipul Lechința în țesutul radicular (Figura 3.37).

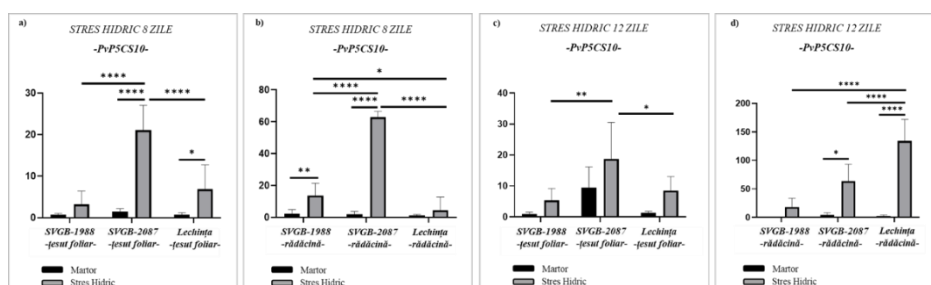


Figura 3.37. Expresia relativă a genei *PvP5CS10*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular.

Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicate biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2. Analiza unor gene reglatorii implicate în răspunsul față de stresul hidric

Atunci când plantele cresc și se dezvoltă într-un mediu mai puțin favorabil, acestea declanșează anumite mecanisme, care le permit să supraviețuiască. Astfel, la nivel molecular activitatea unor gene precum cele funcționale și reglatorii, devine mai intensă. Genele reglatorii sunt reprezentate de produșii de sinteză responsabili de transmiterea semnalului, dar și factorii de transcripție, care sunt implicați în activarea unor gene funcționale. Cele două categorii de gene sunt implicate în mod indirect în răspunsul față de stresul abiotic.

3.15.2.1. Expresia relativă a genei *PvABA'8H*

ABA sau acidul abscisic este un fitohormon cu numeroase implicații în procesele fiziologice ale plantelor. În perioadele de stres hidric, acidul abscisic poate produce diferite modificări la nivel fiziologic, molecular sau biochimic, prin care planta se poate adapta și poate supraviețui în lipsa apei. Gena *PvABA'8H* codifică acidul abscisic 8-hidroxilaza, o enzimă ce participă la reacția de catabolizare a acidului abscisic. Expresia genei *PvABA'8H*

a înregistrat valori mai mari în țesutul foliar, comparativ cu cel radicular, pentru toate cele trei variante studiate, după cele 8 zile de stres hidric. După 12 zile de secetă, expresia genei a fost mai accentuată în cazul genotipului SVGB-1988, atât în țesutul foliar, cât și în rădăcină, cele mai mici valori fiind observate pentru varietatea Lechința în frunză și pentru SVGB-2087 în rădăcină (Figura 3.38).

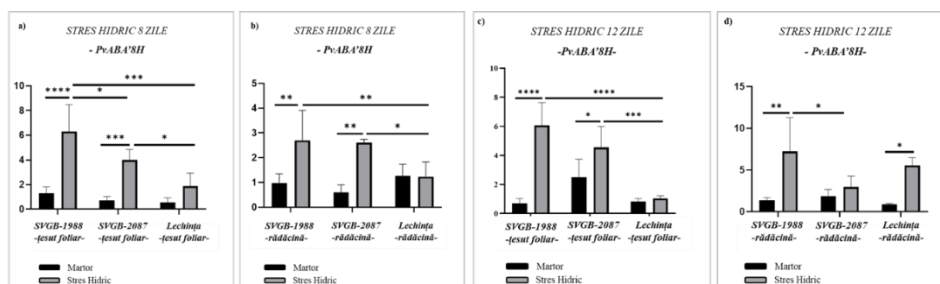


Figura 3.38. Expresia relativă a genei *PvABA'8H*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular. Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicare biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2.2. Expresia relativă a genei *PvPP2C-12*

PP2C fosfataza este cunoscută ca reglând negativ răspunsul mediat de ABA. Prin expunerea celor trei genotipuri la 8 zile de stres hidric, a fost observată o scădere a expresiei pentru genotipul Lechința în ambele țesuturi (frunză/rădăcină) și o creștere în cazul variantelor SVGB-1988 și SVGB-2087 în frunză și în radăcină pentru SVGB-1988. Prin intensificarea stresului hidric (12 zile secetă), expresia genei *PvPP2C-12* a scăzut pentru cele trei genotipuri, în țesutul foliar și a crescut în țesutul radicular pentru Lechința și SVGB-2087 (Figura 3.39).

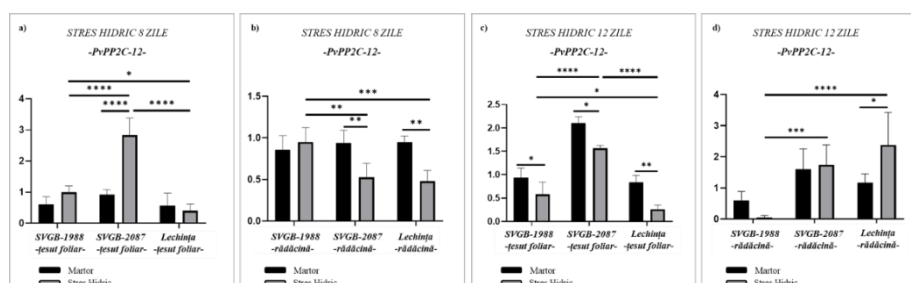


Figura 3.39. Expresia relativă a genei *PvPP2C-12*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular. Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicare biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2.3. Expresia relativă a genei *PvDREB1*

DREB1 (*Dehydration Responsive Element Binding*) este un factor de transcripție a cărui expresie crește atunci când plantele sunt expuse unui stres abiotic. În cadrul acestui studiu a fost analizată expresia genei *PvDREB1* pentru cele trei variante, astfel după 8 zile de secetă au fost înregistrate creșteri ale expresiei în țesutul foliar și scăderi în țesutul radicular, pentru toate genotipurile studiate. Prin extinderea perioadei de secetă, valoarea expresiei genei *PvDREB1* a scăzut, din nou, pentru toate cele trei variante în rădăcină și a crescut în țesutul foliar pentru genotipurile SVGB-2087 și Lechința (Figura 3.40).

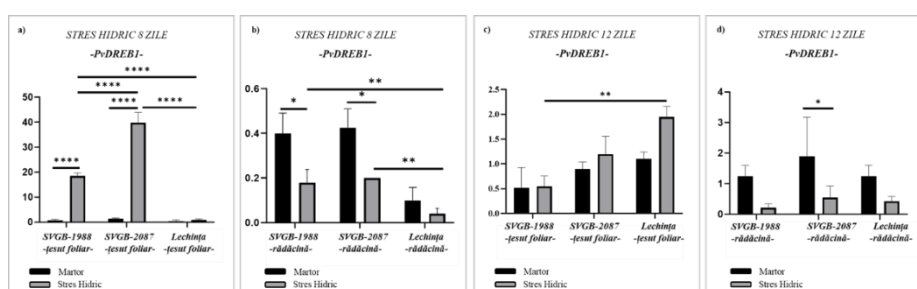


Figura 40. Expresia relativă a genei *PvDREB1*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular. Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicare biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2.4. Expresia relativă a genei *PvDREB2*

După o perioadă de 8 zile de stres hidric au fost înregistrate valori diferite ale expresiei genei *PvDREB2*, pentru cele trei genotipuri, în funcție de țesutul evaluat. În frunză au fost observate creșteri ale expresiei și valori mai mici ale expresiei în țesutul radicular. Cele 12 zile de secetă au avut un efect diferit în ceea ce privește expresia genei *PvDREB2*, în special la nivel radicular, unde au fost înregistrate creșteri ale expresiei pentru genotipurile SVGB-2087 și Lechința (Figura 3.41).

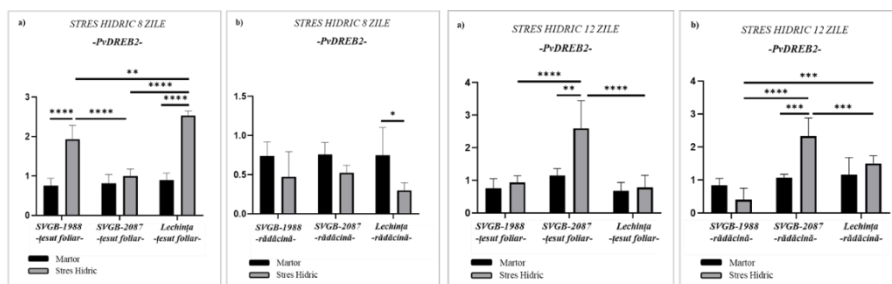


Figura 3.41. Expresia relativă a genei *PvDREB2*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular. Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicare biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2.5. Expresia relativă a genei *PvDREB6*

Expresia genei *PvDREB6* a fost cuantificată după 8 și 12 zile de stres hidric atât din frunză, cât și din țesutul radicular. Astfel, după 8 zile de stres hidric expresia genei *PvDREB6* a scăzut pentru toate variantele studiate în țesutul radicular și foliar, exceptând varietatea Lechința, care la nivelul frunzei a înregistrat o ușoară creștere a expresiei. Pentru cel de-al doilea experiment (12 zile secetă) au fost observate scăderi ale expresiei genei *PvDREB6*, pentru cele trei genotipuri în țesutul foliar și radicular, cu excepția variantei Lechința care a înregistrat o creștere semnificativă a expresiei genei *PvDREB6* în rădăcină (Figura 3.42).

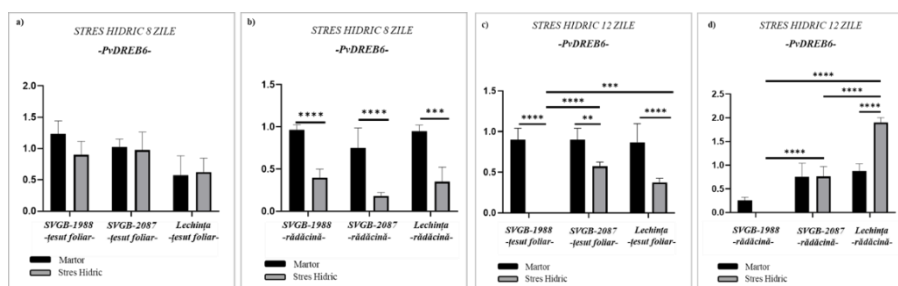


Figura 3.42. Expresia relativă a genei *PvDREB6*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular. Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicare biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2.6. Expresia relativă a genei *PvERF*

Ethylene Responsive Factor (ERF) este un factor de transcripție implicat în numeroase procese fiziologice, precum creșterea și dezvoltarea plantelor, dar și în procesele

de rezistență la factorii de stres abiotic și biotic (Fatma et al., 2022). După 8 zile de secetă, expresia genei *PvERF* a înregistrat o scădere în țesutul radicular pentru cele trei genotipuri și o creștere la nivelul țesutului foliar pentru varietățile Lechința și SVGB-1988. Rezultate ușor asemănătoare au putut fi observate și prin expunerea plantelor la 12 zile de stres hidric, fiind raportate în general scăderi ale expresiei, exceptând varietatea Lechința, în țesutul foliar (Figura 3.43).

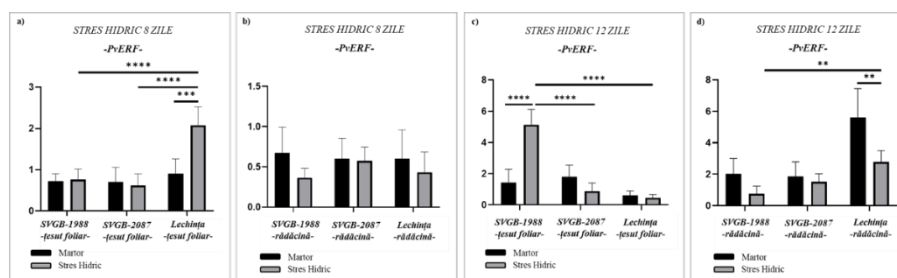


Figura 3.43. Expresia relativă a genei *PvERF*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2.7. Expresia relativă a genei *PvMYB03*

Factorii de transcripție *MYB* au un rol esențial în procesele de dezvoltare, senescență, dar și în răspunsul plantelor la factorii de stres abiotic, precum seceta (Li et al., 2019). Prin expunerea celor 3 varietăți ale speciei *Phaseolus vulgaris* L. la stresul hidric, timp de 8 zile, expresia factorului de transcripție *PvMYB03* a înregistrat o scădere la nivelul țesutului radicular și foliar pentru varietatea SVGB-1988 și o creștere la nivel foliar pentru genotipurile Lechința și SVGB-2087. Prin intensificarea stimulului (12 zile secetă) au fost înregistrate creșteri ale valorii expresiei genei *PvMYB03*, atât în țesutul foliar, cât și în cel radicular, cu mici excepții, privind populațiile Lechința și SVGB-2087, la nivel foliar și radicular (Figura 3.44).

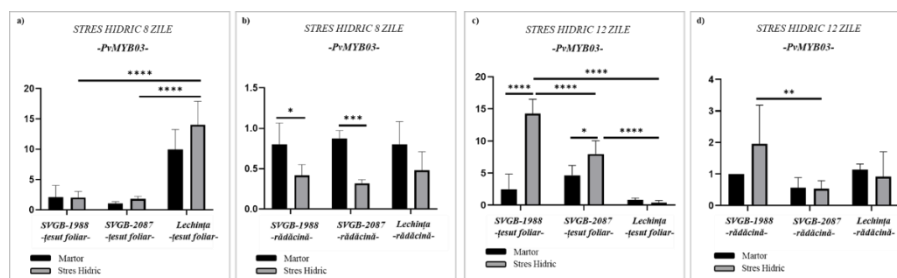


Figura 3.44. Expresia relativă a genei *PvMYB03*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2.8. Expresia relativă a genei *PvMYB07*

După expunerea probelor la 8 zile de stres hidric a fost observată creșterea expresiei genei *PvMYB07* pentru cele trei genotipuri, exceptând varietățile SVGB-2087 și Lechința, la nivel radicular. Rezultate distincte au fost obținute după intensificarea perioadei de secetă, până la 12 zile. Au fost înregistrate creșteri ale expresiei genei *PvMYB07* atât în țesutul foliar, cât și în cel radicular (Figura 3.45).

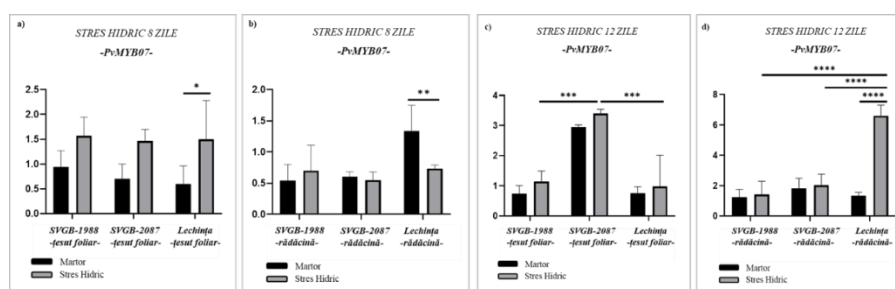


Figura 3.45. Expresia relativă a genei *PvMYB07*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular. Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicare biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2.9. Expresia relativă a genei *PvMYC*

MYC sau *Myelocytomatosis oncogenes* este un factor de transcripție ce are rolul de a regla numeroase procese fiziologice în plante, precum creșterea și dezvoltare, procesul de senescență în țesutul foliar, elongarea rădăcinii, dezvoltarea staminelor, producția de semințe, acumularea proteinelor în semințe, dar și procesul de degradare al clorofilei (Chen et al., 2019). După 8 zile de stres hidric expresia factorului de transcripție *PvMYC* a scăzut pentru toate cele trei genotipuri în rădăcină și a crescut în țesutul foliar pentru variantele SVGB-1988 și SVGB-2087. Cele 12 zile de secetă au avut un impact diferit asupra expresiei genei *PvMYC*, înregistrându-se creșteri doar în cazul genotipului Lechința (Figura 3.46).

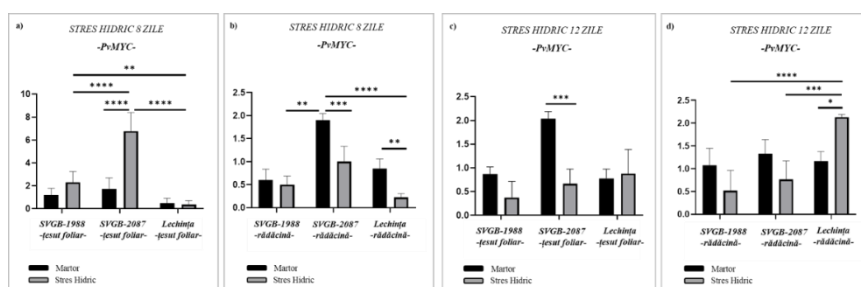


Figura 3.46. Expresia relativă a genei *PvMYC*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular. Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicare biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2.10. Expresia relativă a genei *PvWRKY53*

WRKY reprezintă o familie largă de gene ce codifică proteinele de tip *WRKY* cu implicații în diferite procese biologice. După 8 zile de stres hidric, expresia genei *PvWRKY53* pentru variantele SVGB-2087, Lechința și SVGB-1988 a înregistrat creșteri în țesutul foliar și radicular, exceptând genotipul Lechința, pentru care expresia a scăzut în țesutul radicular. După 12 zile de secetă a fost înregistrată o scădere a expresiei în cazul celor două populații locale studiate, atât în țesutul radicular, cât și în cel foliar, exceptând varietatea Lechința, unde expresia genei *PvWRKY53* a înregistrat o creștere în ambele țesuturi (Figura 3.47).

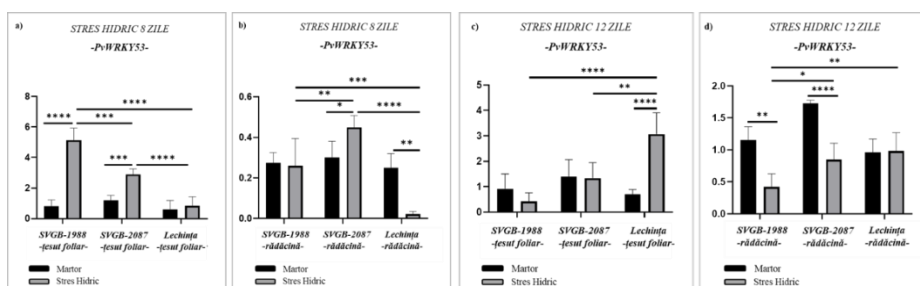


Figura 3.47. Expresia relativă a genei *PvWRKY53*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular.

Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicare biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

3.15.2.11. Expresia relativă a genei *PvWRKY57*

Expunerea celor trei variante ale speciei *Phaseolus vulgaris* L. la 8 zile de secetă a avut un impact diferit privind expresia genei *PvWRKY57*, în funcție de țesutul evaluat. Astfel, la nivelul țesutului foliar a fost înregistrată o creștere a expresiei și o scădere la nivel radicular, pentru toate variantele. Intensificarea stimulului aplicat (12 zile secetă) a dictat valori diferite ale expresiei, în funcție de varianta studiată și țesutul analizat. Au fost raportate creșteri ale expresiei pentru genotipul SVGB-2087 în țesutul foliar și pentru varietatea Lechința în rădăcină; în celelalte situații expresia genei *PvWRKY57* a scăzut (Figura 3.48).

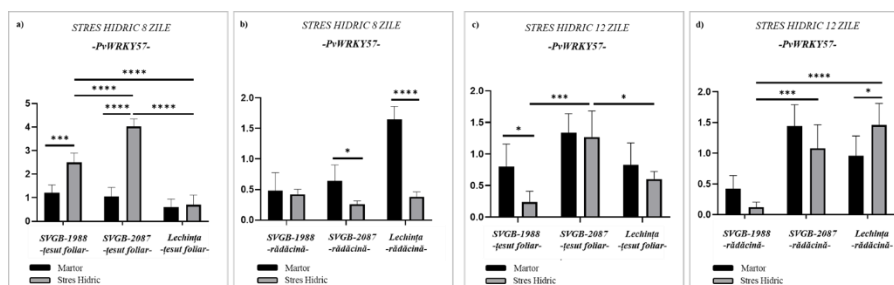


Figura 3.48. Expresia relativă a genei *PvWRKY57*, după 8 și 12 zile de secetă- pentru varietățile- SVGB-1988, SVGB-2087 și Lechința: a) țesutul foliar; b) țesutul radicular; c) țesutul foliar; d) țesutul radicular. Bara reprezintă media valorii pentru cinci replicate biologice, în timp ce bara de eroare indică deviația standard a variației datelor. Diferențele dintre loturi sunt exprimate statistic, unde: $p > 0,05$ (ns); $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***) ; $p \leq 0,0001$ (****)

Rezultatele obținute în urma cuantificării expresiei celor 13 gene implicate în creștere, dezvoltare și răspuns la factorul de stres hidric, pentru cele trei genotipuri pot fi urmărite și în Figura 3.49.

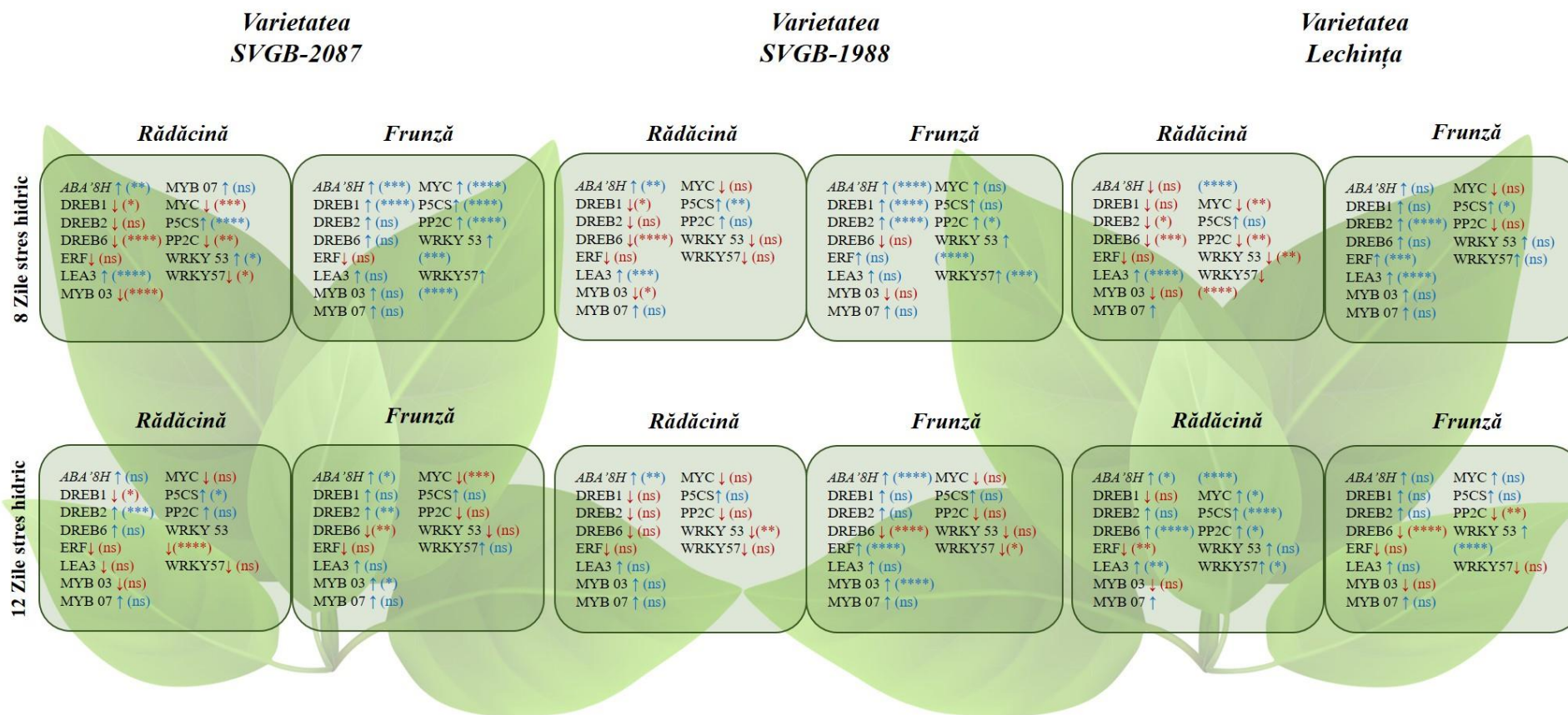


Figura 3.49. Schematizarea diferențelor obținute, la nivel molecular între loturile irigate și neirigate timp de 8 și 12 zile, în urma determinării expresiei relative a unor gene implicate în creștere, dezvoltare și răspunsul față de factorul de stres hidric, pentru cele trei varietăți studiate (SVGB-2087, SVGB-1988 și Lechința) și evidențierea semnificației statistice a acestora

CONCLUZII

Prima parte a tezei de doctorat a presupus o analiză detaliată a literaturii de specialitate, care a permis ulterior formularea unor idei:

1. De-a lungul timpului, omul a exploatat în favoarea lui diferite plante, pe care le-a selectat și adaptat nevoilor personale. Astfel, pornind de la speciile sălbatice, prin procesul de evoluție și selecție realizată de om, au rezultat varietățile locale ale culturilor de interes; mai apoi necesitatea a impus crearea unor soiuri și hibrizi;
2. Biodiversitatea plantelor este amenințată de intervenția omului, de schimbările climatice, dar și de interesul tot mai scăzut al populației, de a realiza o conservare *on farm* și de a menține biodiversitatea locală a culturilor;
3. Conservarea varietăților locale și a rudelor sălbatice ale plantelor de cultură, a căror existență este amenințată și riscă să dispară, a devenit o activitate primordială;
4. Organizația pentru Alimentație și Agricultură (FAO) plasează cultura *Phaseolus vulgaris* L., pe primul loc din categoria legumnoaselor, ca importanță la nivel mondial;
5. Stresul hidric reprezintă unul dintre cei mai importanți factori ce limitează productivitatea din sectorul agricol, iar efectele acestuia sunt devastatoare. Seceta duce la pierderi de până la 70% din producția de *Phaseolus vulgaris* L. la nivel mondial, afectând astfel securitatea alimentară.

În cadrul acestei lucrări de cercetare, materialul biologic a fost reprezentat de specia *Phaseolus vulgaris* L., iar scopul principal, al primei părți practice din cadrul lucrării, a fost acela de a studia relația filogenetică dintre populațiile locale colectate din diferite județe ale țării, precum și analiza filogeografică a probelor selectate. Concluziile lucrării de cercetare sunt următoarele:

6. Evaluarea secvențelor *PvDREB5A* a permis clasificarea probelor în funcție de originea lor geografică. Prin urmare, 5 dintre populațiile evaluate sunt originare din bazinul Andean, iar celelalte prezintă polimorfisme specifice bazinului Mezoamerica;
7. Prin evaluarea genei codificatoare *PvRPS4*, a fost identificat un polimorfism uninucleotidic (mutație nonsinonimă), specific originii geografice, ce poate fi folosit în studiile de biogeografie, ca marker de identificare a originii geografice. Acest aspect nu a fost menționat până în prezent în literatura de specialitate;
8. La nivelul genei *PvDREB6B* s-a constatat cea mai mare diversitate nucleotidică, o parte dintre polimorfismele uninucleotidice fiind caracteristice regiunii geografice. De

asemenea, anumite populații au prezentat SNP caracteristice ambelor bazine, acest lucru poate sugera că, la un moment dat, în timpul proceselor de evoluție s-a realizat fenomenul de hibridizare între populațiile Andine și Mezoamericane.

9. Spațiile intergenice *trnT-trnL* și *rpoC1-rpoC2* sunt caracterizate de o variabilitate nucleotidică mai mică și din nou, diferită în funcție de originea geografică;
10. Regiunea *PvLEA3* din genomul nuclear a permis distribuirea cladistică a celor 27 de probe în cadrul unui arbore filogenetic, în funcție de originea geografică;
11. Studiile realizate la nivel morfologic nu pot releva în mod clar și obiectiv originea geografică a genotipurilor de *Phaseolus vulgaris* L., astfel, acestea trebuie însoțite întotdeauna de studiile desfășurate la nivel molecular, pentru confirmare și validare.

A doua parte practică a tezei a avut ca scop identificarea reacțiilor de răspuns la stresul hidric, ale populațiilor locale ce aparțin speciei *Phaseolus vulgaris* L., cu origini geografice diferite. Concluziile privind rezistența plantelor la stresul hidric sunt:

12. Determinările la nivel fenotipic au indicat că, varietățile Lechința și SVGB-1988 (originară din bazinul geografic Andean) sunt cele mai rezistente la secetă, iar SVGB-2087 prezintă o adaptabilitate mult mai scăzută la mediul slab hidric;
13. Cuantificarea pigmentilor asimilatori, precum clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila totală și carotenoidele au relevat din nou, că, varietățile Lechința și SVGB-1988 sunt cele mai rezistente la secetă, comparativ cu SVGB-2087, genotip cu origini Mezoamericane;
14. Prin analiza microscopică a structurilor celulare s-a demonstrat că genotipul Lechința este cel mai rezistent la secetă, fiind urmat de SVGB-1988 (originar din bazinul geografic Andean), iar cele mai puține mecanisme de adaptare la mediul slab hidric au fost semnalate în cazul varietății originare din bazinul geografic Mezoamerica, SVGB-2087;
15. Determinarea parametrilor fiziologici precum, RGR și RWC au scos în evidență aceleași aspecte, varietatea SVGB-2087 este cea mai slab rezistentă la lipsa apei;
16. Cuantificarea expresiei unor gene implicate în creștere, dezvoltare și răspuns la factorul de stres hidric a impus o altfel de clasificare a populațiilor de *Phaseolus vulgaris* L., în funcție de rezistența la stresul hidric, astfel, genotipul Lechința este cel mai rezistent, acesta fiind urmat de SVGB-2087 și SVGB-1988.

Relațiile filogenetice dintre populații diferite ale speciei *Phaseolus vulgaris* L., datele privind originea geografică, dar și de indentificarea varintelor cu răspuns pozitiv la factorii de stres abiotic, permit extinderea cercetărilor viitoare, cu privire la:

- Evaluarea unui număr mult mai mare de probe ce aparțin speciei *Phaseolus vulgaris* L. și a altor specii din colecția Băncii de Resurse Genetice Vegetale Suceava, din punct de vedere filogenetic și filogeografic;
- Corelarea polimorfismelor uninucleotidice identificate în regiunile codificatoare cu răspunsul la stresul hidric;
- Evaluarea randamentului producției variantelor cu adaptabilitate crescută la secetă;
- Extinderea studiilor, privind rezistența la alți factori de stres ai speciei *Phaseolus vulgaris* L.

Publicații:

1. „Assessment of the Geographic Origin of Romanian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces Using Molecular Markers and Morphological Traits”, by Paula-Maria Galan, Livia-Ioana Leti, Silvia Strajeru, Denisa-Elena Petrescu, Mirela-Mihaela Cimpeanu, Alina-Carmen Tanasa, Dan-Marius Sandru and Dragoș-Lucian Gorgan, *Agronomy* 2023, 13(11), 2820; I.F. 3,7. <https://doi.org/10.3390/agronomy13112820>.
2. „Comparative Effects of Water Scarcity on the Growth and Development of Two Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes with Different Geographic Origin (Mesoamerica/Andean)”, by Paula-Maria Galan, Lacramioara-Carmen Ivanescu, Livia-Ioana Leti, Maria Magdalena Zamfirache and Dragoș-Lucian Gorgan, *Plants* 2024, 13(15), 2111; I.F. 4. <https://doi.org/10.3390/plants13152111>.

Manifestări Științifice Naționale:

1. „Studiul filogenetic și filogeografic al speciei *Phaseolus vulgaris* L. din colecția Băncii de Resurse Genetice Vegetale „Mihai Cristea” Suceava”. Simpozion Național „Utilizarea sustenabilă a biodiversității agricole” la Banca de Resurse Genetice Vegetale „Mihai Cristea” Suceava – 30 mai 2022. Autori: Galan Paula-Maria, Leți Livia-Ioana, Gorgan Dragoș-Lucian. Prezentare orală.
2. „Evaluarea filogenetică și filogeografică a speciei *Phaseolus vulgaris* L. din colecția Băncii de Resurse Genetice Vegetale Mihai Cristea Suceava”. Sesiunea anuală de referate

- și comunicări științifice - Stațiunea de Cercetare Dezvoltare Agricolă Secuieni. 2023. Autori: Galan Paula-Maria, Leți Livia-Ioana, Gorgan Dragoș-Lucian. Prezentare orală.
3. „Efectele stresului hidric asupra dezvoltării plantelor ce aparțin speciei *Phaseolus vulgaris* L., cu origini geografice diferite, Mesoamerica și Andean”. Sesiunea de Comunicări Științifice Banca de Resurse Genetice Vegetale „Mihai Cristea” Suceava - 2023. Autori: Galan Paula-Maria, Leți Livia-Ioana, Gorgan Dragoș-Lucian. Prezentare orală.
 4. „Identificarea variantelor genetice de *Phaseolus vulgaris* L. cu origini geografice diferite (Mezoamerica/ Andean) ce prezintă răspuns pozitiv la secetă în contextul încălzirii globale”. Conferința Aniversară a ICAR, Academia de Științe Agricole și Silvicultură Gheorghe Ionescu-Șișești București, 30 mai 2024. Autori: Galan Paula-Maria, Leți Livia-Ioana, Străjeru Silvia, Gorgan Dragoș-Lucian. Prezentare orală.
 5. „Identificarea variantelor genetice de *Phaseolus vulgaris* cu răspuns pozitiv la factorii de stres hidric în contextul încălzirii globale”, SSFB 2023, Iași. Autori: Galan Paula-Maria, Leți Livia-Ioana, Gorgan Dragoș-Lucian, Ivănescu Lăcrămioara-Carmen, Zamfirache Maria-Magdalena, Străjeru Silvia, Petrescu Denisa-Elena. Prezentare poster.

Membru în proiecte naționale și internaționale:

1. 01/09/2020 – În curs. “INCREASE - Colecții Inteligente de Resurse Genetice de Leguminoase Alimentare pentru Sistemele Europene de Produse Agroalimentare”. Proiect European.
2. 01/03/2020 – 01/12/2022. “Ameliorarea de Precizie a cultivarelor de grâu cu importanță agronomică ridicată” (PN-III-P2-2.1-PED-2019-0175). Proiect Național.
3. 01/11/2022 – 01.10.2023. “Suport educațional și formativ pentru doctoranzi și tineri cercetători în pregătirea inserției în piața muncii” (POCU/993/6/13/153322). Proiect Național.
4. 01/07/2023 – În curs. “Studiul efectelor tratamentelor cu apă activată de plasmă asupra proceselor de germinație la temperaturi scăzute și standard și dezvoltarea speciei *Zea mays*, prin evaluări morfologice, biochimice și ale expresiei genice”; ADER 1.3.4. Proiect Național.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Ali, S., Hayat, K., Iqbal, A., & Xie, L. (2020). Implications of abscisic acid in the drought stress tolerance of plants. *Agronomy*, *10*(9), 1–28. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091323>
2. Anjum, S. A., Ashraf, U., Tanveer, M., Khan, I., Hussain, S., Zohaib, A., Abbas, F., Saleem, M. F., & Wang, L. (2017). Drought tolerance in three maize cultivars is related to differential osmolyte accumulation, antioxidant defense system, and oxidative damage . In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00069>
3. Anonymous. (2001). Common Bean : The Nearly Perfect Food The Importance of Common Bean. *CIAT in Focus Crop Commitment.*, 1.
4. Arunyanark, A., Jogloy, S., Akkasaeng, C., Vorasoot, N., Kesmla, T., Nageswara Rao, R. C., Wright, G. C., & Patanothai, A. (2008). Chlorophyll stability is an indicator of drought tolerance in peanut. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *194*(2), 113–125. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2008.00299.x>
5. Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A., Barbosa Pinto, R., Boatwright, J., Borges, L., Brown, G., Bruneau, A., Candido, E., Cardoso, D., Chung, K.-F., Clark, R., Conceição, A., Crisp, M., Cubas, P., Delgado-Salinas, A., Dexter, K., & (LPWG, T. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, *66*, 44–77. <https://doi.org/10.12705/661.3>
6. Bengough, A. G., Bransby, M. F., Hans, J., McKenna, S. J., Roberts, T. J., & Valentine, T. A. (2006). Root responses to soil physical conditions; growth dynamics from field to cell. *Journal of Experimental Botany*, *57*(2), 437–447. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj003>
7. Berglund-Brücher, O., & Brücher, H. (1976). The south American wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. *Economic Botany*, *30*(3), 257. <https://doi.org/10.1007/BF02909734>
8. Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P. S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., & Papa, R. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.1108973109>
9. Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*, *91*, 179–194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
10. Chacon, M., Pickersgill, B., Debouck, D., & Arias, J. S. (2007). Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant Systematics and Evolution*, *266*, 175–195. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0536-z>
11. Chen, S., Zhao, H., Luo, T., Liu, Y., Nie, X., & Li, H. (2019). Characteristics and expression pattern of MYC genes in triticum aestivum, oryza sativa, and brachypodium distachyon. *Plants*, *8*(8). <https://doi.org/10.3390/plants8080274>
12. Cichy, K. A., Porch, T. G., Beaver, J. S., Cregan, P., Fourie, D., Glahn, R. P., Grusak, M. A., Kamfwa, K., Katuramu, D. N., McClean, P., Mndolwa, E., Nchimbi-Msolla, S., Pastor-Corrales, M. A., & Miklas, P. N. (2015). A *Phaseolus vulgaris* diversity panel for andean bean improvement. *Crop Science*, *55*(5), 2149–2160. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.09.0653>
13. Ciofu, R. (2004). *Tratat de Legumicultură* (C. Bucuresti (ed.)).
14. Costa França, M. G., Pham Thi, A. T., Pimentel, C., Pereyra Rossiello, R. O., Zuily-Fodil, Y., & Laffray, D. (2000). Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, *43*(3), 227–237. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(99\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(99)00060-X)
15. Fang, Y., & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(4), 673–689.

<https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>

16. Fatma, M., Asgher, M., Iqbal, N., Rasheed, F., Sehar, Z., Sofu, A., & Khan, N. A. (2022). Ethylene Signaling under Stressful Environments: Analyzing Collaborative Knowledge. *Plants*, *11*(17), 1–29. <https://doi.org/10.3390/plants11172211>
17. Galan, P.-M., Leti, L.-I., Strajeru, S., Petrescu, D.-E., Cimpeanu, M.-M., Tanasa, A.-C., Sandru, D.-M., & Gorgan, D.-L. (2023). Assessment of the Geographic Origin of Romanian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces Using Molecular Markers and Morphological Traits. In *Agronomy* (Vol. 13, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/agronomy13112820>
18. Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, D. A., & Bashir, S. (2014). Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*, 580–592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.596639>
19. Henry, Robert J. (2005). *Plant Diversity and Evolution Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plant* (Rober J. Henry (ed.); II).
20. Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. A., Graham, C. H., Johnson, J. B., Rissler, L., Victoriano, P. F., & Yoder, A. D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *54*(1), 291–301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.09.016>
21. Hrmova, M., & Hussain, S. S. (2021). Plant transcription factors involved in drought and associated stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115662>
22. Hussain, S. S., Raza, H., Afzal, I., & Kayani, M. A. (2012). Transgenic plants for abiotic stress tolerance: current status. *Archives of Agronomy and Soil Science*, *58*(7), 693–721. <https://doi.org/10.1080/03650340.2010.540010>
23. Hussain Wani, S., Brajendra Singh, N., Haribhushan, A., & Iqbal Mir, J. (2013). Compatible Solute Engineering in Plants for Abiotic Stress Tolerance - Role of Glycine Betaine. *Current Genomics*, *14*(3), 157–165. <https://doi.org/10.2174/1389202911314030001>
24. Kadioglu, A., Terzi, R., Saruhan, N., & Saglam, A. (2012). Current advances in the investigation of leaf rolling caused by biotic and abiotic stress factors. *Plant Science*, *182*, 42–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.013>
25. Kaplan, L., & Lynch, T. F. (1999). *Phaseolus* (Fabaceae) in Archaeology: AMS. *Economic Botany*, *53*(3), 261–272. <https://doi.org/10.1007/BF02866636>
26. Konzen, E. R., Recchia, G. H., Cassieri, F., Gomes Caldas, D. G., Berny Mier Y Teran, J. C., Gepts, P., & Tsai, S. M. (2019). DREB genes from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) show broad to specific abiotic stress responses and distinct levels of nucleotide diversity. *International Journal of Genomics*, *2019*. <https://doi.org/10.1155/2019/9520642>
27. Lewis, G. P., Schrire, B., Mackinder, B., Rico, L., & Clark, R. (2013). A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context — A tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany*, *89*, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.005>
28. Li, X., Guo, C., Ahmad, S., Wang, Q., Yu, J., Liu, C., & Guo, Y. (2019). Systematic analysis of MYB family genes in potato and their multiple roles in development and stress responses. *Biomolecules*, *9*(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biom9080317>
29. Lizana, C., Wentworth, M., Martinez, J. P., Villegas, D., Meneses, R., Murchie, E. H., Pastenes, C., Lercari, B., Vernieri, P., Horton, P., & Pinto, M. (2006). Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress I. Effects of drought on yield and photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, *57*(3), 685–697. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj062>
30. Mahmood, T., Khalid, S., Abdullah, M., Ahmed, Z., Shah, M. K. N., Ghafoor, A., & Du, X. (2020). Insights into drought stress signaling in plants and the molecular genetic basis of cotton drought tolerance. *Cells*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/cells9010105>
31. Marais, R. M. and D. (2017). The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultural Water Management*, *Volume 180*, 118–125.
32. Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, *21*(3), 361–370. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.361>
33. Myers, J. R., & Kmiecik, K. (2017). *Common Bean: Economic Importance and Relevance to Biological Science Research BT - The Common Bean Genome* (M. Pérez de la Vega, M. Santalla, & F. Marsolais (eds.); pp. 1–20). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319->

63526-2_1

34. Nasir, M. W., & Toth, Z. (2021). Response of different potato genotypes to drought stress. *Agriculture (Switzerland)*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/agriculture11080763>
35. Nayek, S., Choudhury, I., Haque, Nishika, J., & Roy, S. (2014). Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4, 2231–2606. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340072>
36. Ozturk, M., Turkyilmaz Unal, B., García-Caparrós, P., Khursheed, A., Gul, A., & Hasanuzzaman, M. (2021). Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1321–1335. <https://doi.org/10.1111/ppl.13297>
37. Pastenes, C., Porter, V., Baginsky, C., Horton, P., & Gonzalez-Cruz, J. (2005). Paraheliotropism can protect water-stressed bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants against photoinhibition. *Journal of Plant Physiology*, 161, 1315–1323. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2003.09.002>
38. Patmi, Y. S., Pitoyo, A., Solichatun, & Sutarno. (2020). Effect of drought stress on morphological, anatomical, and physiological characteristics of Cempo Ireng Cultivar Mutant Rice (*Oryza sativa* L.) strain 51 irradiated by gamma-ray. *Journal of Physics: Conference Series*, 1436(1), 012015. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1436/1/012015>
39. Polania, J. A., Poschenrieder, C., Beebe, S., & Rao, I. M. (2016). Effective Use of Water and Increased Dry Matter Partitioned to Grain Contribute to Yield of Common Bean Improved for Drought Resistance. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, p. 660). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00660>
40. Porch, T. G., Beaver, J. S., Debouck, D. G., Jackson, S. A., Kelly, J. D., & Dempewolf, H. (2013). Use of Wild Relatives and Closely Related Species to Adapt Common Bean to Climate Change. In *Agronomy* (Vol. 3, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/agronomy3020433>
41. Qayyum, A., Al Ayoubi, S., Sher, A., Bibi, Y., Ahmad, S., Shen, Z., & Jenks, M. A. (2021). Improvement in drought tolerance in bread wheat is related to an improvement in osmolyte production, antioxidant enzyme activities, and gaseous exchange. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(9), 5238–5249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.040>
42. Rasmusson, D. C., & Phillips, R. L. (1997). Plant Breeding Progress and Genetic Diversity from De Novo Variation and Elevated Epistasis. *Crop Science*, 37(2), crops1997.0011183X003700020001x. <https://doi.org/https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700020001x>
43. Razi, K., & Muneer, S. (2021). Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(5), 669–691. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874280>
44. Reinprecht, Y., Schram, L., Marsolais, F., Smith, T. H., Hill, B., & Pauls, K. P. (2020). Effects of Nitrogen Application on Nitrogen Fixation in Common Bean Production. *Frontiers in Plant Science*, 11(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01172>
45. Rendón-Anaya, M., Montero-Vargas, J. M., Saburido-Álvarez, S., Vlasova, A., Capella-Gutierrez, S., Ordaz-Ortiz, J. J., Aguilar, O. M., Vianello-Brondani, R. P., Santalla, M., Delaye, L., Gabaldón, T., Gepts, P., Winkler, R., Guigó, R., Delgado-Salinas, A., & Herrera-Estrella, A. (2017). Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biology*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1190-6>
46. Sæther, bjørnar. (2013). Socio-economic Unity in the Evolution of an Agricultural Cluster. *European Planning Studies*, 22, 2605–2619. <https://doi.org/10.1080/09654313.2013.849228>
47. Shavrukov, Y., Kurishbayev, A., Jatayev, S., Shvidchenko, V., Zotova, L., Koekemoer, F., De Groot, S., Soole, K., & Langridge, P. (2017). Early flowering as a drought escape mechanism in plants: How can it aid wheat production? *Frontiers in Plant Science*, 8(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01950>
48. Singh, S. P., Nodari, R., & Gepts, P. (1991). Genetic Diversity in Cultivated Common Bean: I. Allozymes. *Crop Science*, 31(1), crops1991.0011183X003100010004x. <https://doi.org/https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100010004x>
49. Talbot, D. R., Adang, M. J., Slightom, J. L., & Hall, T. C. (1984). Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major seed storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. *Molecular and General Genetics MGG*, 198(1), 42–49. <https://doi.org/10.1007/BF00328698>
50. Tardieu, F., Simonneau, T., & Muller, B. (2018). The Physiological Basis of Drought Tolerance in

- Crop Plants: A Scenario-Dependent Probabilistic Approach. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 733–759. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040218>
51. Vidak, M., Šatović, Z., Liber, Z., Grdiša, M., Gunjača, J., Kilian, A., & Carović-Stanko, K. (2021). Assessment of the Origin and Diversity of Croatian Common Bean Germplasm Using Phaseolin Type, SSR and SNP Markers and Morphological Traits. In *Plants* (Vol. 10, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/plants10040665>
52. Watts, D. (2012). Sauer, Carl Ortwin. The Early Spanish Main. Berkeley, University of California Press, 1966. 306 pages. *Cahiers de Géographie Du Québec*, 11(24), 590. <https://doi.org/10.7202/020758ar>
53. Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
54. Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>
55. Zheng, J., NAKATA, M., UCHIYAMA, H., MORIKAWA, H., & TANAKA, R. (1991). *Giemsa Patterns and Vigna in Several Species of Phaseolus Fabaceae Jianyu Zheng , Masashi Nakata , Hiroshi Uchiyama , Hiromichi Morikawa and Ryuso Tanaka Botanical Institute , Faculty of Science , Hiroshima , Hiroshima. 1975, 459–466.*
56. Zohary, D. (1999). Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46(2), 133–142. <https://doi.org/10.1023/A:1008692912820>