Paula IANCU

Paula IANCU

Metode clasice și moderne de cercetare utilizate în genetica vegetală

Editura UNIVERSITARIA
Craiova, 2026

Referenți științifici:
Prof. univ. dr. Mihai BOTU
Conf. univ. dr. Mariana NICULESCU

Copyright © 2026 Editura Universitaria
Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universitaria

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
IANCU, PAULA
Metode clasice şi moderne de cercetare utilizate în genetica vegetală / Paula Iancu. - Craiova : Universitaria, 2026
Conţine bibliografie
ISBN 978-606-14-2300-2

57

© 2026 by Editura Universitaria
Această carte este protejată prin copyright. Reproducerea integrală sau parțială, multiplicarea prin orice mijloace și sub orice formă, cum ar fi xeroxarea, scanarea, transpunerea în format electronic sau audio, punerea la dispoziția publică, inclusiv prin internet sau rețele de calculatoare, stocarea permanentă sau temporară pe dispozitive sau sisteme cu posibilitatea recuperării informațiilor, cu scop comercial sau gratuit, precum și alte fapte similare săvârșite fără permisiunea scrisă a deținătorului copyrightului reprezintă o încălcare a legislației cu privire la protecția proprietății intelectuale și se pedepsesc penal și/sau civil în conformitate cu legile în vigoare.

PREFAȚĂ

Cunoașterea eredității și variabilității organismelor are importanță teoretică și practică. Genetica este una din ramurile noi ale biologiei care a făcut progrese uriașe în aprofundarea cunoștințelor despre ereditate și mai ales în elaborarea de metode de transformare a plantelor și animalelor în conformitate cu nevoile umane.

Lucrarea *Metode clasice și moderne de cercetare utilizate în genetica vegetală* prezintă cititorilor tehnicile folosite în lucrările de citogenetică și în transformarea eredității organismelor. Acestea includ atât tehnici clasice, cât și moleculare, utilizate pentru analiza structurii și numărului cromozomilor, precum și pentru identificarea anomaliilor genetice. Aceste metode sunt complementare și utilizate în funcție de scopul cercetării, oferind o imagine complexă asupra modificărilor genetice la nivel cromozomial și molecular.

Studiul cromozomilor este esențial în citogenetica vegetală pentru înțelegerea și manipularea materialului genetic al plantelor. Cromozomii, structuri celulare observabile în timpul diviziunilor celulare, joacă un rol crucial în păstrarea și transmiterea informației ereditare. De asemenea, cromozomii poartă informația genetică. Studiul lor contribuie la înțelegerea legăturilor dintre cromozomi și a rolului genelor în exprimarea fenotipică a caracteristicilor plantelor. Studiul cromozomilor permite determinarea nivelului de ploidie la plante. Cercetările în domeniul aneuploidiei deschid perspective pentru ameliorarea

plantelor, permițând înlocuirea sau adăugarea de cromozomi valoroși de la alte soiuri pentru a transfera gene de rezistență la boli sau secetă. Se pot studia efectele unor factori precum virușii, care pot influența conjugarea cromozomilor și distribuția materialului genetic în celulele fiice ale plantelor, iar factorii de mediu, cum ar fi temperatura scăzută sau prezența colchicinei, pot influența mărimea cromozomilor în celulele vegetale.

Tehnicile de citogenetică convențională implică analiza numărului și structurii cromozomilor prin formarea cariotipului, în timp ce tehnicile de citogenetică moleculară, precum hibridizarea *in situ* fluorescentă (FISH), detectează cromozomi sau loci specifici prin utilizarea de probe ADN marcate fluorescent. Studiul cromozomilor mitotici este o practică obișnuită în laboratoarele de citogenetică vegetală, folosind, de exemplu, meristeme radiculare de ceapă (*Allium cepa*).

Sper că această lucrare va constitui un important sprijin pentru studenți, cadre didactice și cercetători din domeniul geneticii. Autorul mulțumește tuturor celor care vor binevoi ca prin observații critice să contribuie la îmbunătățirea ei.

PARTEA I
GENETICA MOLECULARĂ ȘI CELULARĂ

CAPITOLUL I

NOȚIUNI GENERALE DE MICROSCOPIE

1.1. Metode și tehnici uzuale de laborator folosite în citogenetică

Genetica, știință biologică apărută odată cu lucrările lui Gregor Mendel denumite "Versuche Uber Phlantzenhybriden" (1965) a cunoscut ulterior o dezvoltare rapidă și puternică. Descoperirea mijloacelor de investigație a organismelor (microscopia optică și electronică, analizele spectrale, biochimice, etc.) au fost utilizate la identificarea multiplelor aspecte ale eredității, variabilității și determinismul caracterelor, ceea ce a permis dezvoltarea geneticii și elucidarea a numeroase probleme legate de ereditate.

Ereditatea, conform DEX, reprezintă însușirea viețuitoarelor de a transmite urmașilor caracterele genetice specifice fiecărei specii.

Variabilitatea este proprietatea ființelor vii de a-și schimba, sub influența mediului și a eredității, însușirile morfologice, fiziologice, biochimice, etc.

Citogenetica, ramură a geneticii, studiază organitele celulare cu rol genetic. Acestea pot fi observate numai după dobândirea cunoștințelor și deprinderilor necesare în utilizarea

metodelor și tehnicilor folosite în lucrările de citogenetică în legătură cu realizarea și examinarea preparatelor microscopice.

Materiale necesare: microscoape optice/fotonice/ electronice, coloranți, fixatori, lame și lamele microscopice, țesuturi meristematice (țesuturi vegetale cu caracter embrionar, formate din celule nediferențiate și nespecializate care au capacitatea nelimitată de diviziune celulară. Ele asigură creșterea și dezvoltarea plantelor prin formarea de noi celule și diferențierea acestora în diverse țesuturi definitive. Celulele meristematice au pereți subțiri, citoplasmă abundentă și un nucleu voluminos, fiind situate în special la vârfurile de creștere ale rădăcinilor, tulpinilor și frunzelor), micrometre (ocular și obiectiv).

În funcție de durata de utilizare, preparatele microscopice pot fi: temporare, semipermanente și permanente.

Preparatele temporare prezintă avantajul că se pot realiza rapid, presupunând utilizarea unor tehnici simple de lucru, motiv pentru care sunt foarte frecvent utilizate în lucrările de citogenetică.

La realizarea tipurilor de preparate se parcurg următoarele etape comune de prelucrare a materialului biologic:

- fixarea și conservarea acestuia, constând în inactivarea rapidă a celulelor, în scopul păstrării nemodificate a structurii lor. În acest sens sunt utilizate o serie de substanțe fixatoare și conservanți precum: formol, acid osmic, amestecul eter-alcool, amestecul alcool-glicerină, fixatorul Navașin, etc.;

- colorarea preparatelor. Tehnicile de laborator utilizează o gamă largă de coloranți pentru diferențierea diferitelor componente ale celulelor: reactivul Schiff, verde de iod, violet de gențiană, carmin, soluție Giemsa, cromomicină, etc.

Pentru asigurarea reușitei colorării, aceasta trebuie precedată de operația de hidroliză, care are ca scop distrugerea învelișului celulelor și asigurarea realizării reacțiilor chimice dintre colorant și materialul biologic. Hidroliza cu acid clorhidric normal (HCl 1N) reprezintă o operație obligatorie pentru evidențierea cromozomilor prin colorarea cu reactiv Schiff, eliberându-se grupele aldehidice din ADN și facilitarea reacției de colorare;

- etalarea preparatelor (răspândirea într-un strat subțire și omogen a materialului biologic sau a microorganismelor pe lame (lamă) în vederea examinării la microscop. Aceasta este o etapă esențială pentru obținerea unui preparat microscop vizibil, unde elementele sunt distribuite uniform, evitându-se suprapunerea acestora, ceea ce facilitează analiza detaliată). Un preparat bine realizat trebuie să conțină un singur strat de celule astfel încât operația respectivă devine necesară mai ales atunci când se utilizează ca material biologic meristemele în diviziune.

Etalarea se realizează prin apăsarea lamelei peste materialul biologic, urmată de lovirea repetată a acesteia cu un băț de chibrit (partea lemnoasă).

Preparatele permanente se obțin prin includerea materialului biologic în substanțe ce asigură o conservare prelungită a acestora, cum ar fi amestecul glicerină-gelatină sau balsamul de Canada. Înainte de includerea materialului biologic în aceste substanțe trebuie să se realizeze deshidratarea acestuia, deoarece prezența apei este incompatibilă cu păstrarea preparatului o perioadă îndelungată de timp.

Pentru studiul materialului biologic timp de câteva zile se recurge la preparatele semipermanente. Acestea se realizează

prin lipirea (etanșeizarea) lamelei cu parafină sau soluție de lipit de lamă, păstrate la frigider (4 °C).

1.1.1. Metoda de realizare a preparatelor temporare

Materiale necesare: carmin, acid acetic glacial, apă distilată, hârtie de filtru, lame, lamele, meristeme în diviziune (păstrate la frigider).

Mod de lucru: se pun la încolțit semințe de diverse specii, în germinator sau prin așezarea lor pe hârtie de filtru umedă, în vase Petri. Cel mai adesea se utilizează rădăcinuțele de la bulbii de ceapă (*Allium cepa*) imersionați în vase cu apă, metodă ce asigură obținerea unui material biologic în doar câteva zile.

După recoltare, materialul biologic se fixează prin păstrarea minim 2-3 zile în soluție de fixat în fiole mici de sticlă sau 2-3 ore la congelator. Se pune apoi materialul pe o sticlă de ceas pyrex peste care se toarnă soluție carmin-acetică. Se încălzește cu grijă, la flacăra unei lămpi de spirt, fără a evita fierberea, până ce materialul devine moale și se colorează intens. Pentru preparatele a căror membrană este mai rezistentă, se adaugă în soluția carmin-acetică câteva picături de HCl 1N, ușurându-se astfel hidroliza materialului.

Soluția carmin-acetică (colorantul) se prepară amestecând 55 ml apă distilată cu 45 ml acid acetic glacial și 0,5 g carmin. Se amestecă aceste componente într-un balon de sticlă, se agită bine, se lasă să fiarbă câteva minute, se agită din nou și se lasă să se răcească, apoi se filtrează. Păstrarea se face în sticle brune.

Cu o pensetă se ia un vârf meristematic, detașat cu ajutorul unui bisturiu sau lamă de ras, material ce este aplicat într-o picătură de apă acetică (acid acetic glacial 45 %) pe o lamă

de sticlă. Se aplică lamela microscopică și deasupra acesteia o hârtie de filtru, după care se apasă cu degetul pentru etalarea materialului. Se bate ușor peste lamelă cu un băț de chibrit (partea lemnoasă), în scopul unei cât mai bune etalări. Preparatul astfel obținut se poate păstra de la o zi la alta la frigider, punând pe marginile lamelei parafină sau soluție de lipit.

1.1.2. Metoda de realizare a preparatelor permanente

Materiale necesare: pe lângă cele menționate la metoda anterioară: albumină glicerinată, alcool etilic absolut, benzen, balsam de Canada.

Mod de lucru: procedeul este asemănător celui descris anterior până la aplicarea lamelei. În acest caz se pune pe o față a lamelei o picătură de albumină glicerinată, care se întinde sub forma unei pelicule foarte fine. Se trece lamela, cu fața opusă aceleia pe care s-a aplicat albumina glicerinată, prin flacăra unei lămpi de spirt (lamela se ține cu ajutorul unei pensete), asigurându-se astfel coagularea albuminei în vederea reținerii materialului biologic. Se aplică lamela cu fața pe care se află albumina peste materialul biologic aflat pe lamă pentru etalare, procedând ca mai sus. Apoi, într-o baie cu apă acetică sprijinită la un capăt pe o bară de sticlă, se pune lama cu fața pe care se află lamela în jos în scopul desprinderii acesteia. Materialul biologic se păstrează pe lamelă și pe lamă. Este necesară deshidratarea materialului deoarece prezența apei face imposibilă păstrarea lui îndelungată.

Cu ajutorul pensetei se trec lama și lamela prin câte două băi succesive de deshidratare, după următoarea schemă: alcool etilic absolut; 1/2 alcool etilic absolut + 1/2 benzen; benzen.

Trebuie avut grijă ca lama și lamela să fie orientate în sus cu fața pe care se află materialul biologic. Durata de expunere a lamei și lamelei este de 2-2,5 minute în fiecare baie. După trecerea prin ultima baie de benzen, se pune pe lamă (în locul unde a fost sau este materialul biologic) o picătură de balsam de Canada și se aplică lamela, cu fața pe care se află materialul biologic, peste lamă. Se apasă ușor pentru a nu rămâne bule de aer în preparat.

După evaporarea benzenului, balsamul de Canada se usucă și se întărește nepermițând pătrunderea apei sau aerului.

1.2. Elemente de microscopie

Observațiile efectuate la microscop pot fi însoțite și de unele măsurători ale elementelor ce interesează (dimensiunea celulelor, mărimea sau forma cromozomilor, dimensiunile grăunciorilor de polen, etc.).

Pentru astfel de măsurători este necesar a se determina mai întâi indicele micrometric al ansamblului ocular-obiectiv cu care se lucrează.

Materiale necesare: microscop fotonic, micrometru ocular, micrometru obiectiv, preparate microscopice (de tip squash) de celule sau grăunciori de polen.

Mod de lucru: se pornește de la faptul cunoscut că o diviziune de pe micrometrul ocular are 0,1 mm, în timp ce o diviziune de pe micrometrul obiectiv are 0,01 mm. Se introduce micrometrul ocular în ocular, iar micrometrul obiectiv se așază pe măsuța microscopului.

Se privește prin ocular și se număra diviziunile cuprinse între suprapunerii exacte de linii ale ocularului cu obiectivul.

Numărarea se face separat pentru diviziunile din zona de coincidență de pe micrometrul ocular (n_{oc} = numărul de diviziuni din zona respectivă, numărate pe micrometrul ocular) și micrometrul obiectiv (n_{ob} = numărul de diviziuni numărate pe micrometrul obiectiv în zona de coincidență).

Indicele micrometric (i_m) se calculează cu ajutorul relației:

$$i_m = \frac{nob \; x \; 10}{noc} \text{ (microni)}$$

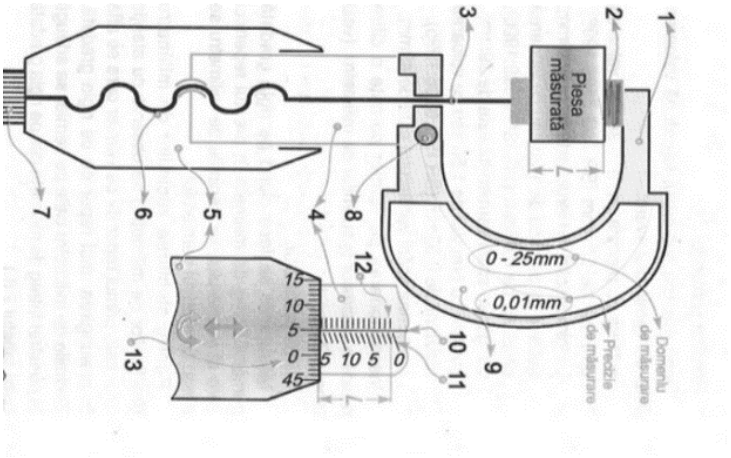


Figura 1. Schița determinării indicelui micrometric

Pentru a înțelege mai bine modul de calculare a indicelui micrometric se ia următorul exemplu (figura 1): să presupunem că pentru combinația obiectiv 40 și ocular 10x, valoarea lui n_{ob} = 5, iar valoarea lui n_{oc} = 22. Corespunzător acestor valori, indicele micrometric i_m = 2,27 microni. Această valoare indică mărimea reală a unei porțiuni din preparatul microscopic, corespunzătoare unei singure diviziuni de pe micrometrul ocular

la garnitura ocular-obiectiv utilizată. Folosirea altor obiective sau oculare, diferite ca putere de mărire față de cele care s-a calculat valoarea indicelui micrometric, impune o nouă determinare a valorilor acestuia.

CAPITOLUL II

CELULA ȘI CONSTITUIENȚII CELULARI IMPLICAȚI ÎN STOCAREA ȘI TRANSMITEREA CARACTERELOR

Ca urmare a cercetărilor moderne de citologie, au putut fi aprofundate considerabil cunoștințele existente despre structura și funcțiile celulei. Acest lucru a fost posibil ca urmare a folosirii unor tehnici noi precum microscopia electronică, electroforeza și cromatografia, ultra-centrifugarea, marcarea cu izotopi radioactivi, etc.

Referitor la stocarea și transmiterea caracterelor ereditare trebuie făcută precizarea că doar o parte din componentele celulei dețin funcții în acest sens. Din acest motiv, la care se adaugă faptul că noțiunile privind structura și părțile componente ale celulei sunt cunoscute, se vor face referiri numai asupra constituenților celulari mai importanți implicați în ereditate. Astfel, informația genetică a unui organism poate fi localizată în:

Nucleul celulelor (somatice și gametice). În acest caz ereditatea este denumită nucleară, fiind controlată de genele plasate pe cromozomii din nucleu (cromogene) (figura 2).

Citoplasma celulelor, caz în care ereditatea se numește citoplasmatică sau extranucleară. Acest tip de ereditate este controlată de așa numitele plasmagene, localizate în: plastide (cloroplaste); mitocondrii; particulele submicroscopice din citoplasmă.

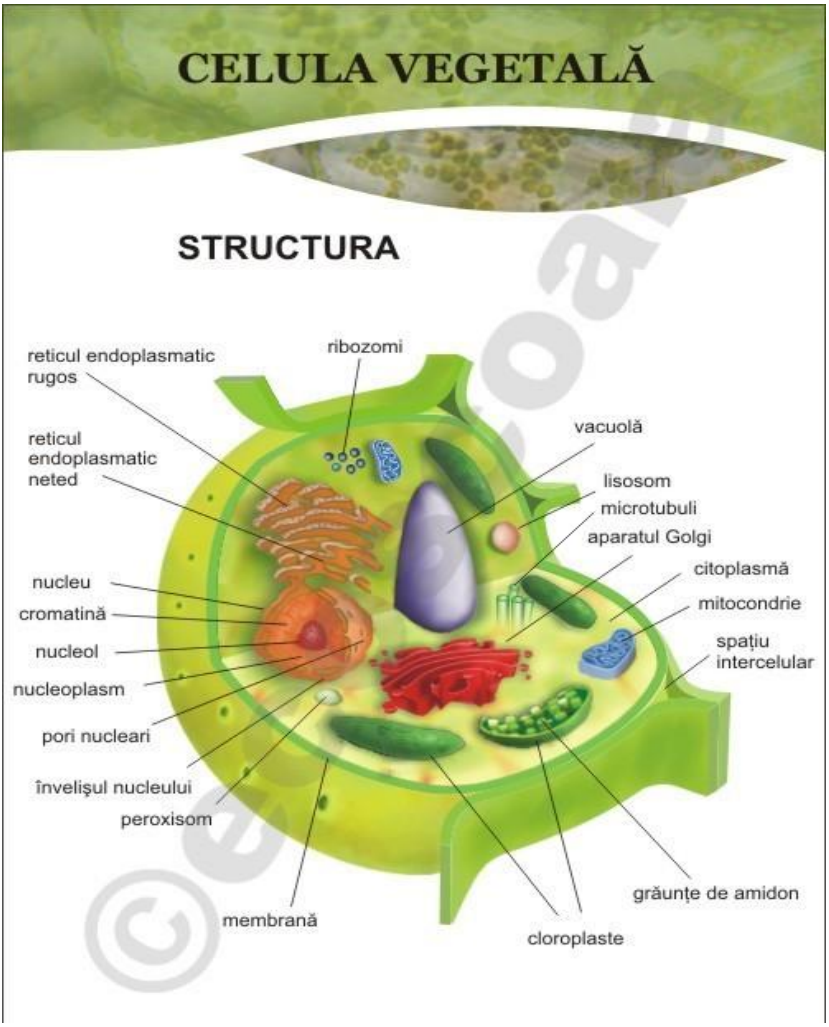


Figura 2. Componentele celulei identificate cu microscopul electronic (https://www.google.com)

Ereditatea de natură nucleară reprezintă 99 % din totalul informației genetice dintr-o celulă, în timp ce ereditatea de natură citoplasmatică are pondere de doar 1 %.