ADER 1.3.4. / 19.07.2023

Studiul efectelor tratamentelor cu apă activată de plasmă asupra proceselor de germinaţie la temperaturi scăzute şi standard şi dezvoltarea speciei *Zea mays* prin evaluări morfologice, biochimice şi ale expresiei genice

Director de proiect: ȘANDRU MARIUS DAN

Banca de Resurse Genetice Vegetale „Mihai Cristea” Suceava

RAPORT DE FAZĂ

Cod	**CONDUCĂTOR DE PROIECT/PARTENERI** (denumirea, CUI) **:**	**Director de proiect/Responsabil de proiect în cadrul unităţii partenere** (nume, prenume, funcţie)	**Adresa de contact** (telefon, e-mail, adresa poştală)
CP	Banca de Resurse Genetice Vegetale „Mihai Cristea” Suceava C.U.I. 39201328	Șandru Marius Dan Cercetător științific III	Telefon: 0230 521 016 Fax: 0230 521 016 Email: office@svgenebank.ro Suceava, Bd. 1 mai, nr. 17 Cod poștal: 720224, Județ Suceava

RAPORT DE FAZĂ

- **Contractor:** Banca de Resurse Genetice Vegetale „Mihai Cristea” Suceava
- **Numărul/codul proiectului:** 134/1.3.4
- **Anul începerii:** 03.07.2023 **Anul finalizării:** 31.10.2026 **Durata** (luni): 40
- **Denumirea proiectului:** 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
- **Denumirea fazei:** Realizarea planului de lucru pentru evaluarea caracteristicilor structurilor celulare ale plantelor analizate in vitro
- **Persoana de contact (director de proiect):** ȘANDRU Marius Dan
- **Date de contact:** tel. 0744889328, e-mail: dan.sandru@svgenebank.ro

PROIECTUL 1.3.4., FAZA 4 - Realizarea planului de lucru pentru evaluarea caracteristicilor structurilor celulare ale plantelor analizate in vitro

Obiectivul general al proiectului:

- Stimularea proceselor de germinație și dezvoltare a speciei *Zea mays* L. subsp. *mays* în condiții de temperaturi scăzute în urma tratamentului cu apă activată de plasmă.

Obiectivele specifice ale proiectului:

- Standardizarea protocolului de expunere a apei la sursa de generare a plasmei, în ceea ce privește timpul și voltajul aplicat;
- Identificarea unor varietăți de porumb mai rezistente la temperaturi scăzute în urma analizelor de germinație, morfo-fiziologie, biochimie și genetică;
- Creșterea gradului de securizare a fondului genetic naţional prin revigorarea semințelor în urma tratamentelor cu apă activată de plasmă;
- Sporirea gradului de utilizare a resurselor genetice prin identificarea şi introducerea formelor valoroase în programele de ameliorare;
- Facilitarea reintroducerii în cultură a unor varietăți care în urma tratamentului cu apă activată de plasmă au devenit mai rezistente la temperaturile scăzute și distribuirea acestora către micii fermieri, cu scopul promovării conservării *on farm*;
- Îmbogățirea literaturii de specialitate cu rezultate privind efectele apei activate de plasmă asupra proceselor de germinație și dezvoltare ale speciei *Zea mays* L. subsp. *mays* în condiții de frig;

- **Obiectivul fazei:**

Studiul microscopic al secțiunilor tisulare din plantele de *Zea mays* L. subsp. *mays*

PROIECTUL 1.3.4., FAZA 4 - Realizarea planului de lucru pentru evaluarea caracteristicilor structurilor celulare ale plantelor analizate in vitro

Activităţile planificate:

- **Activitatea 4.1.** Analiza microscopică a secţiunilor transversale din tulpina plantelor obţinute în cadrul activităţii 2.5. (CP)
- **Activitatea 4.2.** Analiza imaginilor de microscopie optică obţinute în cadrul activităţii 4.1. (CP**)**
- **Activitatea 4.3. -** Diseminarea rezultatelor proiectului prin mijloace specifice (CP)
- **Activitatea 4.4. -** Întocmirea raportului ştiinţific de etapă (CP)
- **Activitatea 4.5**. Întocmirea raportului final de activitate (CP, P1))

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

4.1.1. Scopul activității

Analiza microscopică a secțiunilor transversale din tulpina plantelor obținute în cadrul activității 2.5

- Continuă seria de determinări morfo-fiziologice din Activitatea 2.5
- Extinde investigarea de la scara macroscopică (lungimea rădăcinii și a tulpinii) la cea microscopică
- Analiză histo-anatomică a secțiunilor transversale prin tecile frunzelor plantulelor de *Zea mays* L.
- Urmărește modificările structurale induse în țesuturile tulpinii la cele două varietăți(SVGB-718 și SVGB-11742): temperatura și tipul de apă

Cele 4 variante experimentale

TN + AN
temperatură normală, apă netratată

TN + AAP
temperatură normală, apă activată cu plasmă

TS + AN
temperatură scăzută, apă netratată

TS + AAP
temperatură scăzută, apă activată cu plasmă

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

4.1.2. Material biologic: două accesiuni cu rezistență diferită la frig

Tabelul 1. Detalii din BIOGEN cu privire la varietățile selectate

Accesiune	Proveniență	An colectare	Rată germinare	Rezistență la frig
SVGB-718	Varietate locală, Pojorâta, jud. Suceava	1986	96%	Scăzută
SVGB-11742	Oncești, jud. Bacău	1995	100%	Crescută

Obținerea plantulelor (protocolul Activității 2.5)

14 zile

Cameră de creștere: 22 °C, 16 h lumină / 8 h întuneric, umiditate 65%; udare cu apă netratată sau activată cu plasmă

7 zile

Varianta TS: 4 °C – 8 h, 9 °C – 16 h. Varianta TN rămâne în condițiile inițiale

28 de zile

Vârsta plantulelor la prelevarea secțiunilor din tulpină (momentul analizei morfologice, Activitatea 2.6)

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

4.1.2. Metoda de analiză

1 Prelevare

Fragmente de tulpină din zona mediană a plantulelor, pentru fiecare dintre cele 4 variante

2 Secționare

Secțiuni transversale manuale, cu lama, sub lupa binoculară

3 Examinare

În stare naturală (fără colorare) și după dublă colorare histochimică

4 Microscopie

Microscop optic, măriri de 5×, 10×, 20×, 40× și 100×; imagini de ansamblu și de detaliu

Dublă colorare histochimică – diferențiază țesuturile lignificate de cele nelignificate

Verde de iod: evidențiază componentele celulozice ale peretelui celular

Roșu de rutheniu: evidențiază substanțele pectice din peretele celular primar

Notă: *la 28 de zile, „tulpina” nu este o tulpină adevărată, ci un ansamblu de teci foliare suprapuse.*

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

TN + AN **Proba SVGB-718** temperatură normală, apă netratată

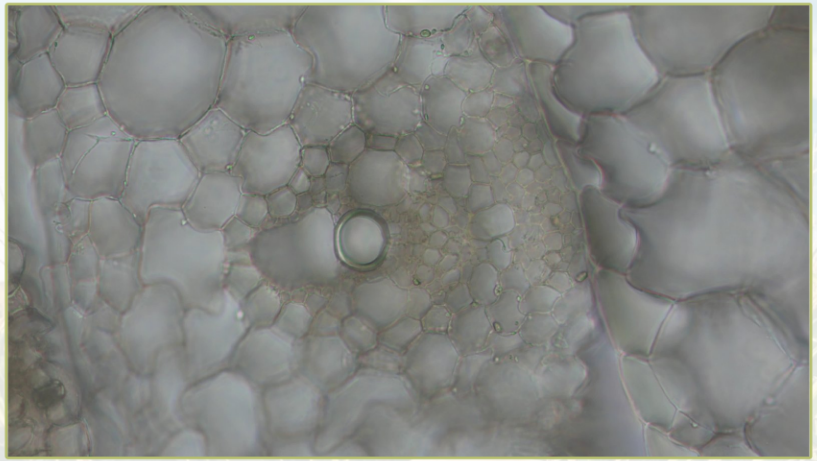


Fig. *4.1a. Aspect general al secțiunii transversale prin tulpină (obiectiv 20×, fără colorare)*

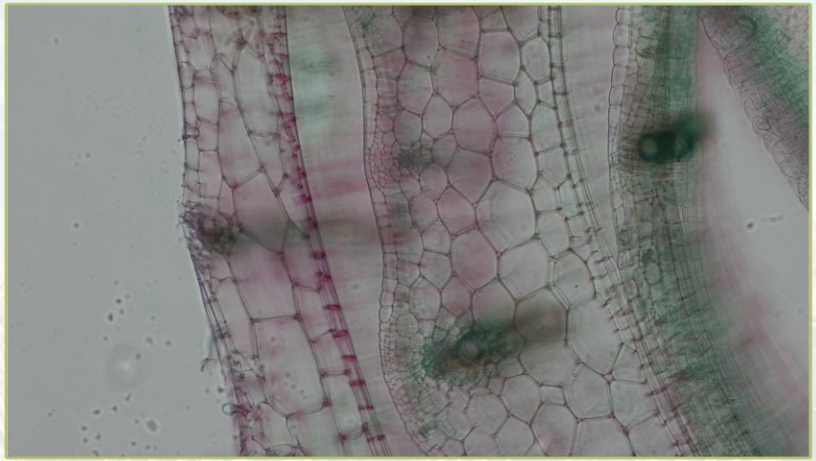


Fig. *4.1b. Detaliu al unui fascicul vascular (obiectiv 20×, verde de iod / roșu de rutheniu)*

- Organizare tipică: epidermă periferică și parenchim fundamental din celule poligonale cu pereți subțiri și spații intercelulare, cu numeroase fascicule vasculare dispersate (atactostelă)
- Fiecare fascicul este delimitat de o teacă sclerenchimatică; metaxilem cu pereți îngroșați, protoxilem cu îngroșări inelare/spiralate

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

TN + AAP **Proba SVGB-718** temperatură normală, apă activată cu plasmă

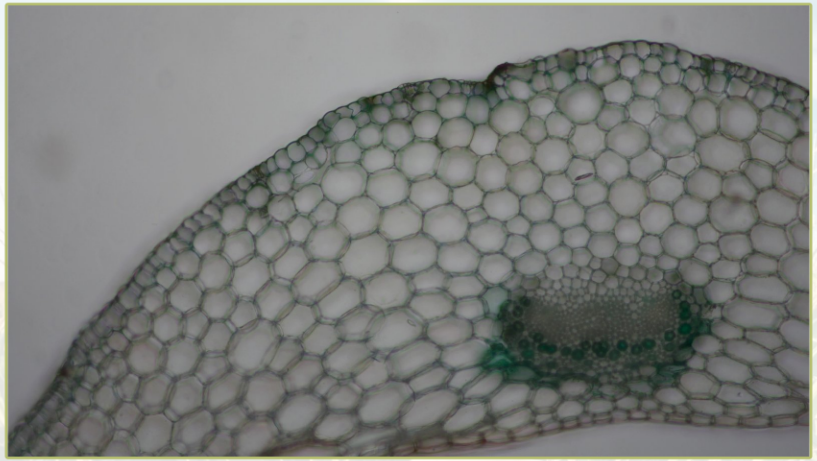


Fig. *4.2a. Aspect general al secțiunii transversale prin tulpină (obiectiv 10×, verde de iod / roșu de rutheniu)*

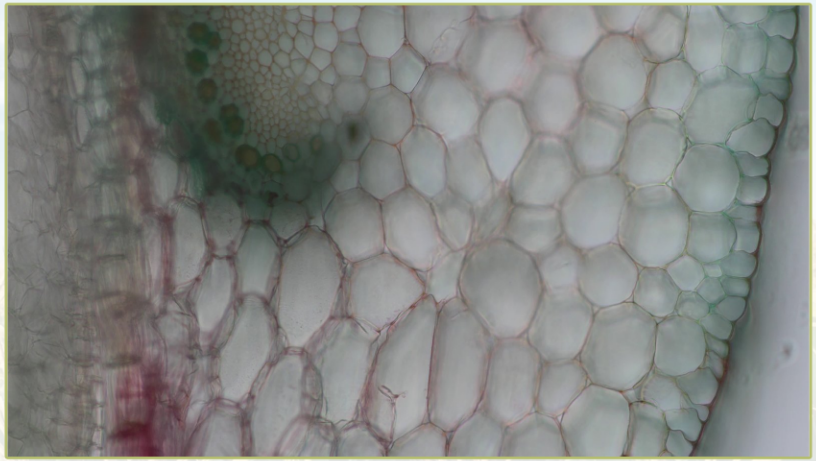


Fig. *4.2b. Detaliu al unui fascicul vascular (obiectiv 20×, verde de iod / roșu de rutheniu)*

- Structură generală și dispunere atactostelă similare martorului; metaxilem cu pereți lignificați intens colorați și zone pectice roz-purpurii adiacente fasciculelor
- Fără diferențe structurale majore calitativ; diferențele cantitative (dimensiunea fasciculelor, grosimea tecii sclerenchimatice) vor fi evaluate prin măsurători comparative

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

TS + AN **Proba SVGB-718** temperatură scăzută, apă netratată

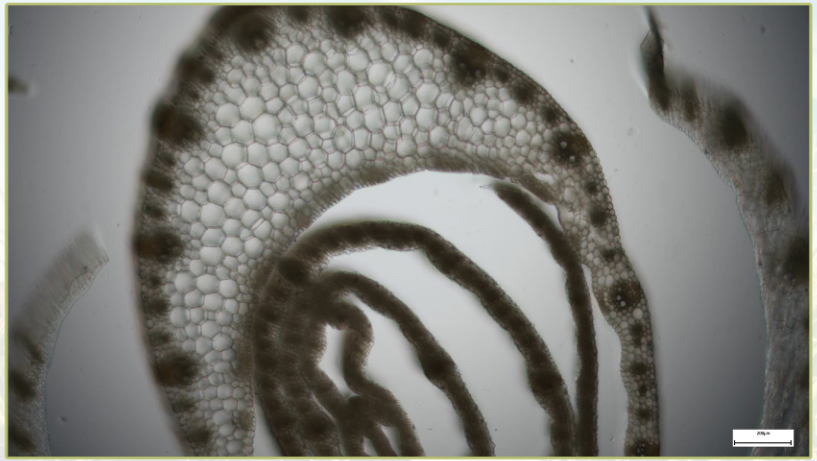


Fig. *4.3a. Aspect general al secțiunii transversale prin tulpină (obiectiv 5×; bară de scală 200 µm)*

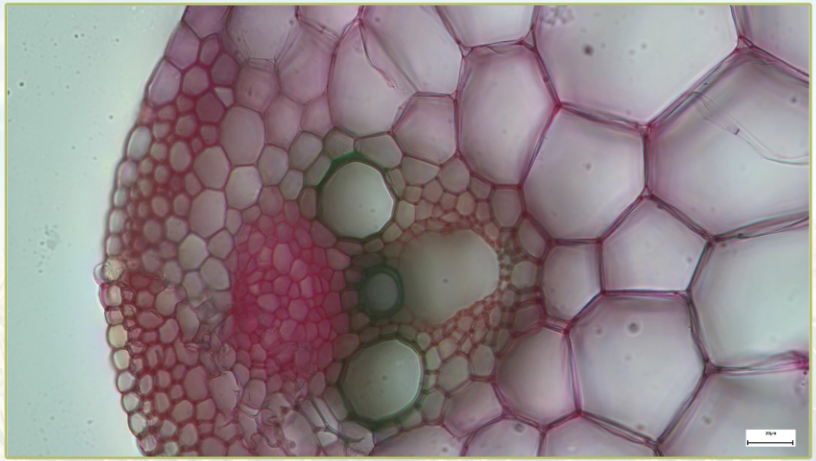


Fig. *4.3b. Detaliu al unui fascicul vascular (obiectiv 40×; bară de scală 100 µm)*

- Organizare generală comparabilă cu variantele TN; colorare mai intensă cu roșu de rutheniu în parenchimul fundamental, deci conținut pectic mai vizibil în pereții celulari – posibil răspuns adaptativ la frig
- Fasciculele își păstrează structura, cu metaxilem bine delimitat, înconjurat de celule mici, dens grupate

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

TS + AAP **Proba SVGB-718** temperatură scăzută, apă activată cu plasmă

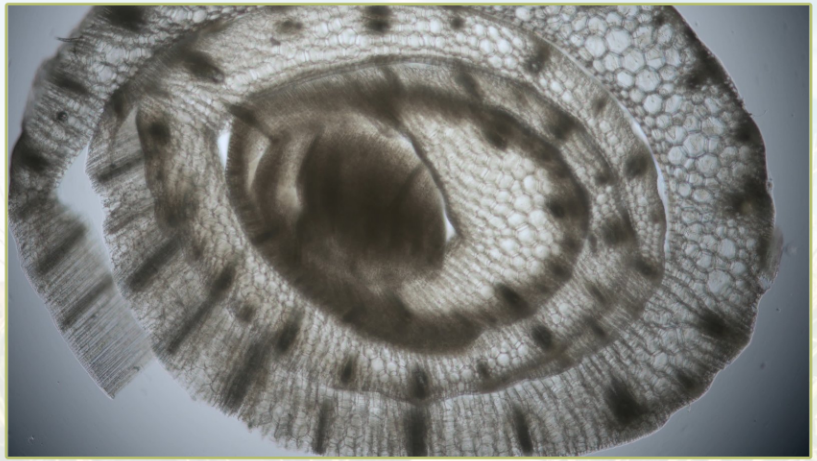


Fig. *4.4a. Aspect general al secțiunii transversale prin tulpină (obiectiv 5×)*

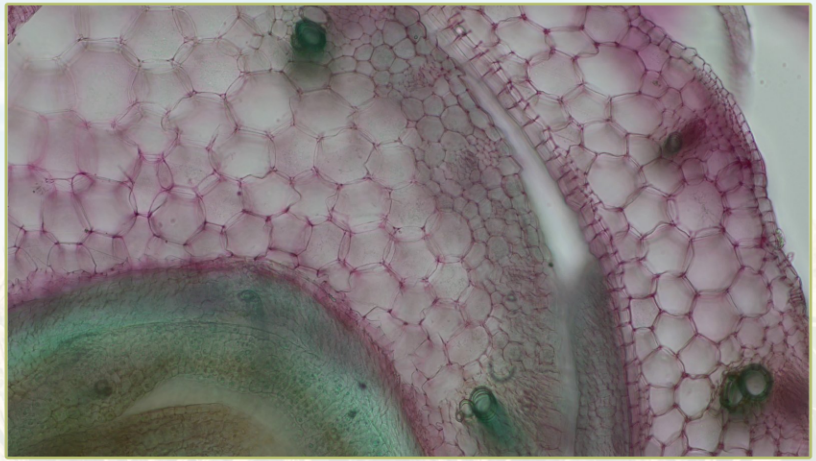


Fig. *4.4b. Detaliu al unui fascicul vascular (obiectiv 20×)*

- Colorare pectică intensă în parenchimul fundamental; organizare atactostelă tipică, cu fascicule numeroase, bine delimitate de teci sclerenchimatice
- Fără diferențe structurale evidente între cele două variante expuse la frig (TS + AN și TS + AAP)

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

TN + AN **Proba SVGB-11742** temperatură normală, apă netratată

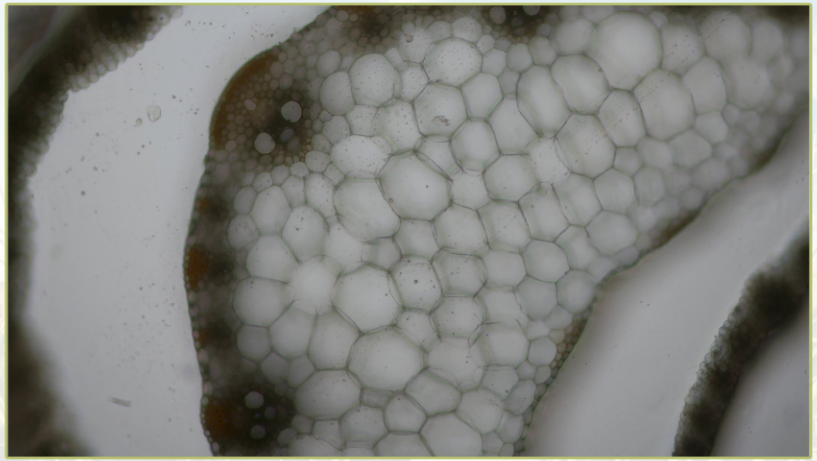


Fig. *4.5a. Aspect general al secțiunii transversale prin tulpină (obiectiv 10×, fără colorare)*

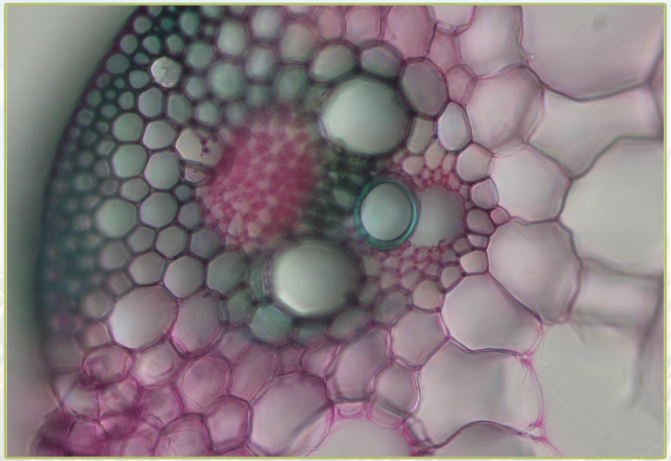


Fig. *4.5b. Detaliu al unui fascicul vascular (obiectiv 40×, verde de iod / roșu de rutheniu)*

- Aceeași organizare atactostelă ca la SVGB-718: epidermă periferică și parenchim cu celule poligonale și spații intercelulare, cu numeroase fascicule vasculare
- Metaxilem intens colorat în verde, alături de protoxilem și de țesut pectic adiacent, roșu-violaceu

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

TN + AAP **Proba SVGB-11742** temperatură normală, apă activată cu plasmă

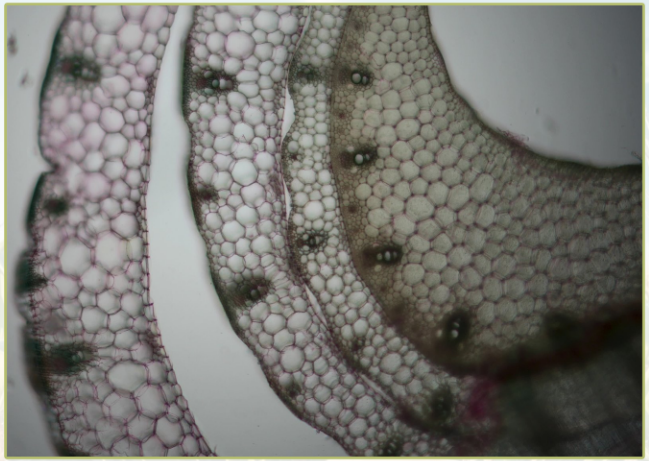


Fig. *4.6a. Aspect general al secțiunii transversale prin tulpină (obiectiv 5×)*

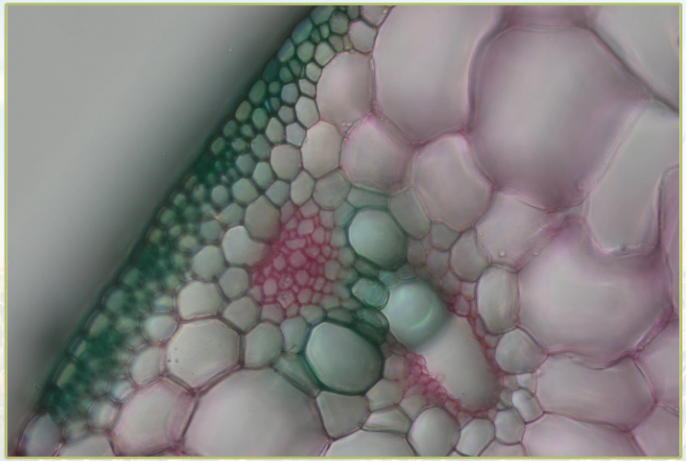


Fig. *4.6b. Detaliu al unui fascicul vascular (obiectiv 40×)*

- Structură generală similară martorului, cu numeroase fascicule vasculare dispuse pe întreaga circumferință a secțiunii
- Fără diferențe structurale majore calitativ față de TN + AN, ca și la proba SVGB-718

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

TS + AN **Proba SVGB-11742** temperatură scăzută, apă netratată

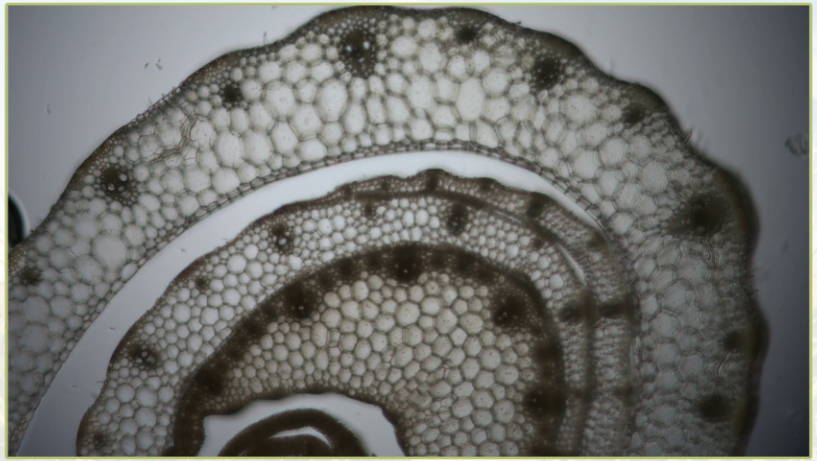


***Fig.** 4.7a. Aspect general al secțiunii transversale prin tulpină (obiectiv 5×)*

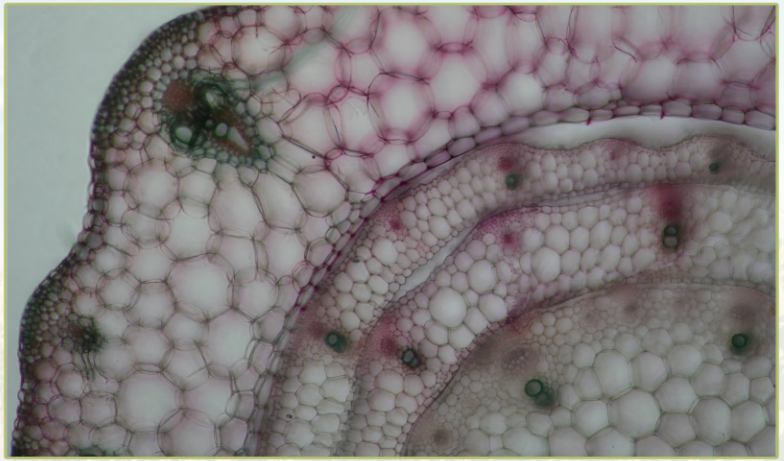


***Fig.** 4.7b. Detaliu al unui fascicul vascular (obiectiv 20×)*

- Organizare generală comparabilă cu variantele TN
- Ca la SVGB-718: colorare mai intensă cu roșu de rutheniu în parenchimul fundamental, deci conținut pectic mai vizibil la nivelul pereților celulari

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.1

TS + AAP **Proba SVGB-11742** temperatură scăzută, apă activată cu plasmă

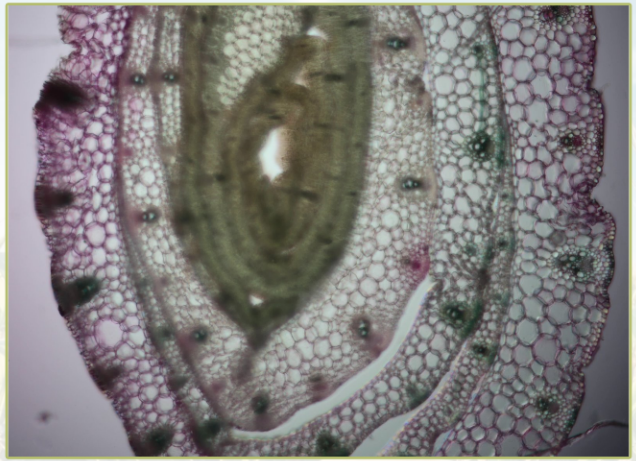


Fig. *4.8a. Aspect general al secțiunii transversale prin tulpină (obiectiv 5×)*

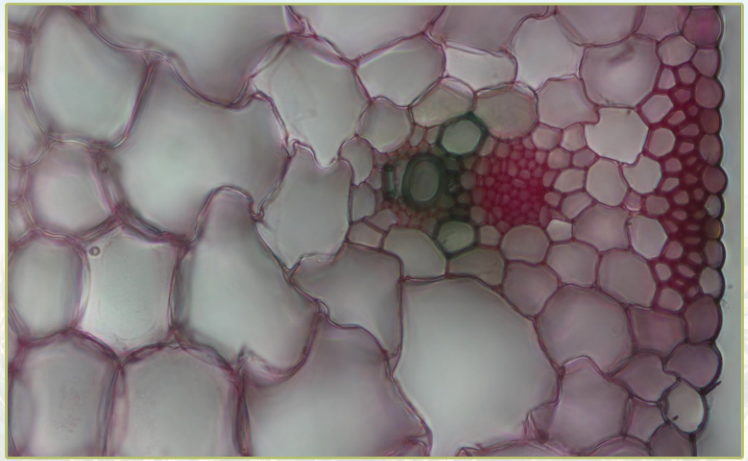


Fig. *4.8b. Detaliu al unui fascicul vascular (obiectiv 40×)*

- Colorare pectică intensă în parenchim, ca la TS + AN; organizare atactostelă tipică, cu numeroase fascicule bine delimitate
- Fără diferențe structurale evidente între cele două variante expuse la frig, consecvent cu SVGB-718

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4

Activitatea 4.2

Cea mai evidentă diferență între grupurile experimentale: efectul temperaturii scăzute

Acest tipar susține ipoteza remodelării compoziției peretelui celular ca răspuns la stresul termic, un fenomen documentat și la alte specii de plante expuse la frig.

Temperatură normală
TN + AN · TN + AAP

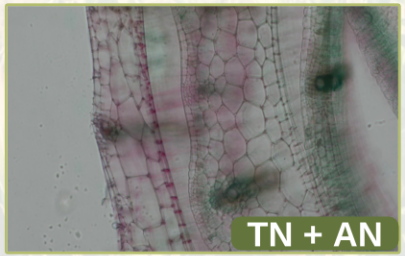
Colorare mai puțin intensă a substanțelor pectice (roșu de ruteniu) în pereții celulari ai parenchimului fundamental – SVGB-11742

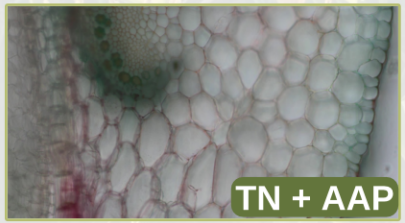
1

Temperatură scăzută
TS + AN · TS + AAP

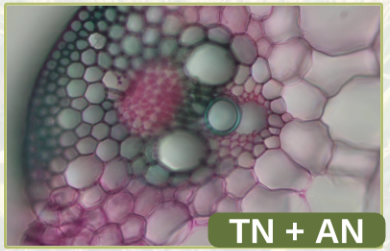
Colorare mai intensă a substanțelor pectice (roșu de ruteniu) în pereții celulari ai parenchimului fundamental – SVGB-718

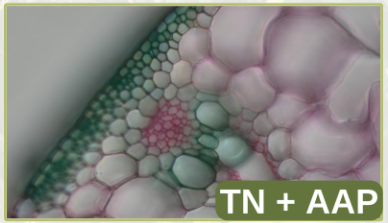
SVGB-718



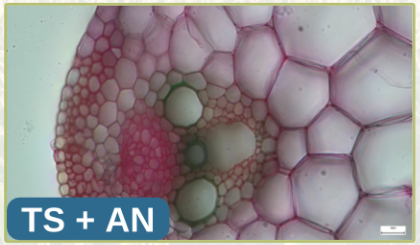


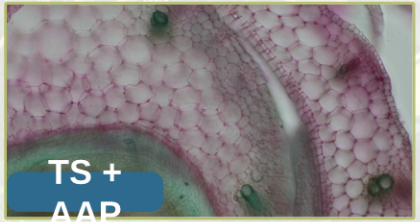
SVGB-11742



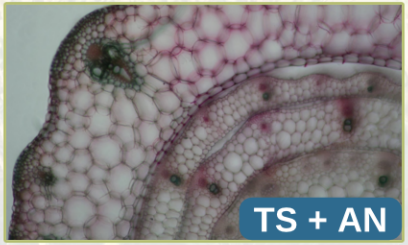


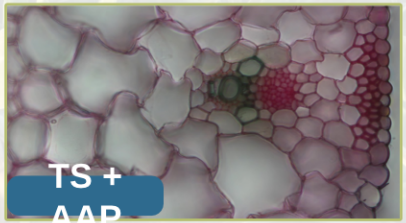
SVGB-718





SVGB-11742





REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.2

Cea mai evidentă diferență între loturi: efectul temperaturii scăzute

Temperatură normală
TN + AN · TN + AAP

Colorare pectică (roșu de rutheniu) de intensitate mai redusă la nivelul pereților celulari din parenchimul fundamental

SVGB-718 | SVGB-11742

Temperatură scăzută
TS + AN · TS + AAP

Intensitate mai mare a colorării pectice (roșu de rutheniu) la nivelul pereților celulari din parenchimul fundamental

SVGB-718 | SVGB-11742

Constant la ambele accesiuni, deși au rezistență diferită la frig

Tiparul întărește ipoteza unei remodelări a compoziției peretelui celular ca răspuns la stresul termic, fenomen documentat la alte specii vegetale supuse frigului

REZULTATE OBȚINUTE ÎN CADRUL FAZEI 4
Activitatea 4.2

Efectul apei activate cu plasmă (AAP): fără diferențe structurale calitative

Accesiune	Efecte AAP – evaluări morfo-fiziologice și biochimice anterioare	Histo-anatomie (calitativ)
SVGB-718 rezistență scăzută la frig	Îmbunătățirea unor parametri: viteza de dezvoltare, masa a 1000 de boabe, rezistența la Fusarium	Fără diferențe structurale atribuibile AAP, la TN sau la TS
SVGB-11742 rezistență crescută la frig	Fără diferențe semnificative	Fără diferențe structurale atribuibile AAP, la TN sau la TS

Interpretare

Absența modificărilor histo-anatomice evidente sugerează că eventualele efecte pozitive ale AAP se manifestă mai degrabă la nivel funcțional și cantitativ decât prin modificarea organizării structurale de bază a țesuturilor.

CONCLUZII
Activitățile 4.1 și 4.2

1. Cele 4 variante experimentale, la ambele accesiuni (SVGB-718 și SVGB-11742), păstrează organizarea histo-anatomică de tip atactostel

2. Temperatura scăzută se asociază cu o colorare pectică mai intensă în parenchimul fundamental, indicând o posibilă remodelare a peretelui celular

3. Nu au fost identificate diferențe structurale calitative atribuibile tratamentului cu apă activată cu plasmă, la nicio accesiune

4. Efectele AAP se manifestă probabil la nivel funcțional și cantitativ; diferențele cantitative (dimensiunea fasciculelor, grosimea tecii sclerenchimatice) vor fi evaluate prin măsurători comparative