



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2010 00926**

(22) Data de depozit: **01.10.2010**

(41) Data publicării cererii:
28.10.2011 BOPI nr. **10/2011**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,**
BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **GAVRILĂ LUCIAN,**
STR. NICOLAE CONSTANTINESCU NR. 12
BL. 15, SC. A, ET. 3 AP. 10 SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **RADU IRINA,** *STR. BARAJUL ARGEȘULUI*
NR. 19, ET. 2, AP. 3, SECT. 1, BUCUREȘTI,
B, RO;
• **BURLIBASA LILIANA,** *BD. MĂRĂȘEȘTI*
NR. 2B, BL. A, SC. 2, AP. 17, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;

• **MAGDALENA LAURA MONICA,**
STR. SG. MAJ. VASILE TOPLICEANU
NR. 15, BL. 42B, SC. 2, ET. 3, AP. 42,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MOTOC ROZALIA MAGDA,**
STR. MITROPOLIT VARLAAM NR. 3,
BL. S3, SC. 1, ET. 1, AP. 6, FOCȘANI, VN,
RO;
• **UȘURELU MARIA DANIELA,** *STR. BIRCA*
NR. 10, BL. M186, SC. A, AP. 50, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **ARDELEAN AUREL,** *BD. REVOLUȚIEI*
NR. 81, ARAD, AR, RO;
• **CARABAS MARIAN,**
STR. NICOLAE BĂLCESCU NR. 1, LIPOVA,
AR, RO;
• **MACOVEI IOANA,** *STR. ANTON PAN,*
BL. 37, SC. A, ET. 1, AP. 5, ROMAN, NT, RO

(54) **GENOSENZORI UTILIZAȚI ÎN APRECIEREA STĂRII DE
SĂNĂTATE A MEDIULUI**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la utilizarea metodelor citogenetice în stabilirea efectului agenților poluanți asupra materialului ereditar, și în cuantificarea gradului de poluare a mediului înconjurător. Procedeele constă în identificarea rapidă a unor restructurări cromozomale, prin analiza cromozomilor politeni din glandele salivare

ale unor larve diptere care trăiesc în ape, pe sol sau în părțile inferioare ale atmosferei.

Revendicări: 1
Figuri: 9



BREVET DE INVENȚIE

Titlul invenției:

GENOSENZORI UTILIZAȚI ÎN APRECIEREA STĂRII DE SĂNĂTATE A MEDIULUI

REZUMAT:

Scopul invenției este reprezentat de promovarea utilizării metodelor citogenetice în stabilirea efectului agenților poluanți asupra materialului ereditar și pe această bază, cuantificarea gradului de poluare a mediului înconjurător (sol, ape, aer).

Procedeul constă în identificarea rapidă a unor restructurări cromozomale, prin analiza cromozomilor politeni din glandele salivare ale unor larve de insecte diptere, care trăiesc în ape (*Chironomus* și *Anopheles*), pe sol (*Mycetophila*) sau în părțile inferioare ale atmosferei (*Rhagoletis* și *Drosophila*).

Originalitatea rezidă în propunerea utilizării modificărilor induse în aparatul ereditar de agenți mutageni/clastogeni aflați în majoritatea preparatelor cu care se realizează combaterea chimică a pestelor, modificări ce au valoare de senzori în aprecierea efectelor nocive ale poluanților, iradierii și ionilor metalelor grele. Asemenea modificări cromozomale au valoarea unor veritabili **genosenzori**, termen care ne aparține și care a fost nu numai acceptat, dar și apreciat la cel de-al XX-lea Congres Internațional de Genetică organizat la Berlin (12-17 iulie 2008), prin decizia comitetului organizator de a trece comunicarea noastră (L. Gavrilă, L. Burlibașa, M.D. Ușurelu, I. Radu, L.M. Magdalena, A. Ardelean, M. Cărăbaș - *Chromosomal rearrangements in Chironomus sp. as genosensors for monitoring environmental pollution*, 2008) de la statutul de poster, la acela de prezentare orală, în sesiuni concurente.

Tot genosenzori trebuie considerate și restructurările cromozomale ale cromozomilor mitotici, precum și anomaliile meiotice induse de acțiunea substanțelor mutagene/clastogene incluzând poluanți de natură diferită, dar identificarea acestora, la plante sau animale, este mult mai dificilă și mai costisitoare. Există și tehnici alternative pentru evidențierea efectelor mutagene ale poluanților, dar ele sunt mult mai costisitoare și, de regulă, neaplicabile în teren. Propunerea noastră evită dificultățile unor investigații laborioase, având relevanța și fezabilitatea specifice obiectivului propus.

Eficiența a fost stabilită pe baza utilizării procedeeului în identificarea efectelor poluării cu deșeuri radioactive depozitate în localitatea Rănușa (jud. Arad) și cu metale grele din apele canalului Mureșul Mort din Arad, comparativ cu biotopuri corespondente, nesupuse poluării artificiale, ceea ce a făcut obiectul tezei de doctorat prezentată de Marian Cărăbaș, în 20 iulie 2010.

Metodologie: Metodologia propusă de autori are în vedere asigurarea implementării invenției în toate Inspectoratele Județene de Protecția Mediului din România, prin asigurarea unei dotări tehnice cu cele mai mici costuri posibile pentru un demers științific fundamental, dar cu aplicabilitate practică imediată.

Astfel, fiecare Inspectorat Județean de Protecția Mediului poate organiza un laborator mobil sau un laborator fix (o singură cameră 3/4m) cu o masă de laborator pe care să fie instalat un microscop optic prevăzut cu sistem de fotografiere sau de desen la camera clară atașată microscopului, o lupă binocular. Facultativ, poate fi utilizat procedeul preluării de imagini cu ajutorul camerei video. Dotarea laboratorului cu materiale este una minimală, și presupune procurarea unei rezerve de câteva zeci de cutii cu *lame microscopice* și cu *lamelle microscopice*, pense și ace spatulate, sticlă de ceas. Ca reactivi este recomandată procurarea de alcool etilic

absolut, acid acetic glacial, apă distilată, praf de carmin și orceină. Cea mai mare parte a necesarului de materiale și reactivi este de proveniență autohtonă.

Se recomandă aplicarea **metodei rapide de colorare a cromozomilor politeni cu aceto-carmin sau aceto-orceină**. Metoda presupune următoarele etape:

1. Se recoltează larvele de stadiu III sau IV de la specii de *Chironomus*, *Mycetophila* sau *Rhagoletis* care urmează să se transforme în pupă. Glandele salivare localizate în partea anterioară a corpului în imediata apropiere a ganglionului cerebroid sunt legate de armătura bucală care apare ca un punct negru prin transparența tegumentului larvar.
2. Larva este depusă pe lama microscopică lângă o picătură de aceto-carmin, aceasta fiind imobilizată prin prinderea părții posterioare cu pensa după care, cu un ac spatulat se face o incizie fermă înapoia = în partea posterioară a punctului negru ce reprezintă armătura bucală, iar printr-o mișcare de smulgere superficială se detașează partea anterioară a corpului larvei, operație în urma căreia glandele salivare ies la nivelul secțiunii odată cu alte componente ale tubului digestiv; în cazul în care glandele salivare nu ies instantaneu se apasă cu acul spatulat peste secțiune, forțând ieșirea acestora. Glandele salivare sunt ușor identificate prin aspectul lor translucid și consistența lor lipicioasă.
3. Glandele salivare recuperate sunt debarasate de alte țesuturi ale larvei, iar impuritățile sunt înlăturate prin spălare, în apă distilată, într-un cristalizor, în care acestea sunt scufundate fiind ținute în vârful acului spatulat, având grijă să fie mai puțin distruse mecanic. După scoaterea din cristalizor, apa distilată se îndepărtează prin atingerea glandelor salivare cu o bucată de hârtie de filtru netedă, după care acestea sunt transferate pe o sticlă de ceas pyrex în aceto-carmin, pentru 10-15 minute, sau se pot lăsa chiar pe lama microscopică într-o picătură de carmin-acetic, care se reîmprospătează periodic, evitându-se evaporarea soluției și uscarea materialului biologic de analizat, până ce acesta capătă o culoare roșie-închisă spre negru. Se pune apoi, o picătură proaspătă de aceto-carmin pe o lamă microscopică curată în care este introdus materialul colorat, peste care se aplică lamela și se apasă peste aceasta ușor cu acul spatulat sau cu un băț de chibrit pentru o etalare menajată, evitându-se astfel alterarea modelului nativ de bandare al cromozomilor politeni. Apoi, cu o hârtie de filtru se îndepărtează excesul de colorant și se efectuează examinarea microscopică.

În cazul în care se are în vedere efectuarea unor investigații complexe și profunde, se pot aplica și alte metode de colorare, precum metoda Feulgen sau metoda de colorare cu fluorocromi (DAPI, quinacrină, acridinorange etc.) cu vizualizare la microscopul cu fluorescență, precum și analiza ultrastructurii cromozomilor politeni, în microscopie electronică de transmisie (TEM).

Metoda de colorare rapidă cu aceto-carmin este practicabilă și pe teren, pe când metoda Feulgen de colorare cu reactiv Schiff (leucofuxină) este mai laborioasă și se recomandă a fi utilizată în laborator fix. Ea presupune următoarele etape:

1. Disecția glandelor salivare ale larvelor din stadiul prepupal (III, la *Drosophila*, *Rhagoletis* și *Mycetophila*, ușor de recunoscut prin dimensiunea mare și prin vivacitatea lor și stadiul IV, la *Chironomus*).
2. Fixarea glandelor salivare în amestecul fixator 3:1 alcool metilic absolut/acid acetic glacial, păstrat la temperatură scăzută; la nevoie fixarea se face la temperatură ambientală în alcool de 70⁰. Fixarea durează 1-2 ore. După fixare, glandele sunt spălate într-un cristalizor cu apă de robinet prin imersie de câteva ori, pentru îndepărtarea fixatorului, după care acestea sunt trecute într-un cristalizor cu apă distilată. După

- îndepărtarea completă a fixatorului, glandele salivare sunt puse pe o lamă microscopică, îndepărtându-se apa distilată cu ajutorul unei bucăți de hârtie de filtru.
3. Urmează operația de hidroliză cu HCl 1N, obligatorie în vederea colorării cromatinei cu leucofuxină. Hidroliza se realizează la termostat, la 60°C, timp de 1-3 minute, după care se înlătură HCl din cristalizor.
 4. Peste glandele salivare se toarnă soluția de leucofuxină în care acestea stau, până ce capătă o culoare roșu-carmin. Colorarea se poate realiza la frigider sau la temperatura camerei.
 5. Pentru realizarea preparatului citologic, se ia o lamă microscopică, pe care se pune o picătură de soluție proaspătă de carmin acetic 1%. Se introduce glanda salivară colorată în picătura de carmin acetic și peste aceasta se aplică lamela microscopică, apoi se face o ușoară apăsare cu o pensă, ac spatulat sau băț de chibrit, realizându-se o etalare prealabilă a celulelor și a cromozomilor. Se îndepărtează excesul de carmin acetic de pe marginile lamelei și se vizualizează la microscop, spre a constata măsura în care cromozomii sunt corespunzător etalați. Dacă brațele cromozomilor politeni nu sunt suprapuse, atunci se realizează o etalare definitivă a acestora, aplicând peste lamelă o bucată de hârtie de filtru, peste care se apasă cu degetul mare, astfel că este înlăturat tot carminul acetic și etalarea cromozomilor politeni este deplină, evidențiindu-se cu claritate modelul de bandare al cromozomilor politeni și alte detalii structurale ale acestora. Asemenea preparate citologice pot fi păstrate ca preparate semipermanente, la frigider, în cutii speciale. Pentru aceasta, peste marginile lamelei se aplică cu atenție lac de unghii, prevenindu-se deplasarea acestora din poziția inițială, rămasă după ce s-a realizat etalarea definitivă. Preparatele semipermanente pot fi păstrate în poziție orizontală, câteva zile, uncori chiar săptămâni, la frigider.

DESCRIEREA INVENȚIEI:

1. STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU:

Dezvoltarea tehnologică rapidă duce inevitabil la modificarea mediului înconjurător datorită poluării apei, solului și aerului. Pentru a putea fi realizată o monitorizare adecvată a gradului de poluare a mediului înconjurător, trebuie identificat efectul agenților poluanți asupra aparatului ereditar al diferitelor organisme vii și pe această bază aprecierea gradului de poluare. Acest deziderat se poate realiza prin analiza cromozomilor politeni incluzând restructurările cromozomale, activitatea organizator nucleolară, replicarea diferențiată și pufarea cromozomilor politeni ai speciilor *Chironomus plumosus*, *Rhagoletis cerasi* și *Mycetophila agarici*. Analiza citogenetică constă în identificarea naturii și incidenței diferitelor restructurări cromozomale la speciile menționate mai sus, modificări ce pot fi considerate genosenzori pentru aprecierea efectelor poluării mediului înconjurător asupra organismelor vii.

În anul 1880, prof. Balbiani, de la Universitatea din Paris a observat pentru prima dată și a descris cromozomii politeni în nucleii celulelor glandelor salivare, de la larvele de *Chironomus plumosus*, observații pe baza cărora el publică, în anul 1881, lucrarea *Sur la structure du noyau de cellules salivaires chez les larves de Chironomus*.

În anul 1930, Kostoff, și apoi în anul 1933, Painter, observă și descriu cromozomii politeni în glandele salivare, de la *Drosophila melanogaster*.

Familia *Chironomidae* este considerată cea mai numeroasă familie de insecte care în stadiu larvar trăiește în sedimentul (bentos) din ecosistemele de apă dulce, fiind totodată o componentă importantă a acestor ecosisteme, deoarece reprezintă o sursă importantă de hrană pentru multe animale acvatice, jucând un rol important în lanțul trofic și în circuitele biogeochimice subsidiare în cadrul ecosistemului, fiind un nod critic între producătorii primari și consumatorii secundari (Porinchi și MacDonald, 2003). Datorită faptului că stadiul larvar este foarte activ metabolic și extrem de sensibil la factorii de stres din mediu, larvele acestei specii au fost folosite ca bioindicatori ai calității mediilor de apă dulce, încă de la începutul anilor 1900. *Chironomidele* au fost folosite de-a lungul timpului în numeroase studii de poluare, observându-se efectul diferitelor metale grele, radiații, pesticide și al altor substanțe toxice asupra larvelor.

Majoritatea speciilor din genul *Chironomus* au seturi haploide mici $n=2$, $n=3$, $n=4$. În nomenclatura utilizată de Michailova și colaboratorii (2009) cele șapte brațe cromozomale politenice de la *Chironomus riparius* au fost desemnate: A, B, C, D, E, F și G. Autoarea apreciază că în evoluția cariotipului speciilor de *Chironomus* un rol important l-au jucat translocațiile reciproce ale brațelor cromozomale, motiv pentru care specii diferite prezintă combinații diferite ale brațelor cromozomale. Pe baza acestui caracter, speciile sunt unite în câteva citocomplexe desemnate AB CD EF *G-thummi*, AE CD BF *G-pseudothummi*, AB CF ED *G-camptochironomus* etc.

Polimorfismul inversiilor la speciile de *Chironomus* a fost observat în fiecare din cele șapte brațe. Brațele A, B, C și D sunt cele mai polimorfice, în timp ce brațele E, F și G sunt mai puțin variabile. Divergența cariotipului speciilor în genul *Chironomus* s-a desfășurat, în principal, prin fixarea, respectiv homozigotarea, în cursul evoluției, a diferitelor inversii paracentrice și a translocațiilor reciproce ale unor întregi brațe cromozomale.

Cariotipurile speciilor de *Chironomus* includ, de obicei, o singură pereche de cromozomi organizator nucleolari. Aceștia sunt, de regulă, cei mai scurți cromozomi ai complementului. Mai

apar și două-trei inele Balbiani care sunt pufuri mari implicate în sinteza de proteine secretorii ale glandei salivare. Cele mai multe specii de *Chironomus* sunt diploide, având un număr de cromozomi $2n=8$.

Setul cromozomal haploid (genomul) la *Chironomus plumosus* este de $n=4$ (Shobanov, 1994, Golygina și Kiknadze, 2001), iar combinația brațelor cromozomale este AB, CD, EF și G. Cromozomii AB (I) și CD (II) sunt metacentrici și sunt cei mai mari, EF (III) este submetacentric, iar cromozomul G (IV) este telocentric, prezentând două inele Balbiani. Și brațul B al cromozomului I prezintă un inel Balbiani. În cromozomul IV este situată regiunea organizator nucleolară (NOR), la nivelul constricției secundare, fapt bine evidențiat în condiții de politenie. Primele trei perechi de cromozomi, de la *Chironomus plumosus*, cuprind cromozomii cei mai lungi și reprezintă aproximativ 90% din genomul acestei specii (Siirin și colab., 2003).

Analiza globală a polimorfismului inversiilor în populațiile naturale a 93 de specii de *Chironomus* din regiuni palearctice și nearctice (Golygina și Kiknadze, 2001, Butler și colab., 1999), pe baza datelor originale și a publicațiilor conținând secvențe precise ale benzilor cartate pe baza standardului *piger*, a permis lui Kiknadze (2005) formarea unei baze de date citogenetice. Populațiile naturale de *Chironomidae* prezintă, de obicei, un nivel înalt de polimorfism mai ales datorită inversiilor paracentrice homozigote și heterozigote (Petrova și colab., 1996, Ilyinskaya și colab., 1999). În plus, există rar și heterozigoți pentru inversii pericentrice, heterozigoți pentru translocații reciproce și heterozigoți în ceea ce privește grosimea benzilor inclusiv benzile centromerice. Prezența de cromozomi B adiționali la o parte dintre indivizii dintr-o populație determină un polimorfism genomic. Inversiile paracentrice modifică ordinea genelor din brațele cromozomale, lucru care se observă în schimbările secvențelor de benzi din cromozomii politeni; numărul și frecvența diferitelor secvențe de inversie în populații pot servi în estimarea nivelului lor de divergență citogenetică.

În ultimii ani, studiile de ecogenetică s-au concentrat pe analiza cromozomilor politeni ai speciilor de *Chironomus*, deoarece s-a constatat că genomul acestor diptere este deosebit de sensibil la substanțele poluante.

Se consideră că genomul speciilor de *Chironomidae* este mult mai sensibil la poluanți decât alte componente ale organismului larvar, iar studiile de biomonitorizare ce folosesc aceste specii se axează, în prezent, pe analize citogenetice sau de genetică moleculară ale larvelor, care permit avertizarea din timp asupra poluării mediului cu diverși contaminanți (Sharley și colab., 2004).

Restructurările cromozomale de tipul inversiei, buclelor de deleție, translocațiilor și duplicațiilor identificate în cromozomii politeni au fost considerate drept indicatori relevanți ai poluării mediului înconjurător, ei putând fi folosiți pentru monitorizarea calității mediului respectiv (Lagadie și Caquet, 1988).

Pentru a verifica dacă există o relație între nivelul de poluare a sedimentului și frecvențele restructurărilor cromozomale și alterărilor funcționale, Michailova și colaboratorii (2000) au comparat frecvențele restructurărilor cromozomale AB, CD și EF în larvele populației de *Chironomus riparius* care populează zona poluată Santena cu aceea a populației larvelor din habitatul Izvorului Corio, considerată drept zonă de referință nepoluată.

Telomerele a doi sau trei cromozomi au prezentat o structură relaxată granulară bine evidențiată la nivelul brațului C sau în regiunea centromerică, având aspect de pseudopuf; în 5% dintre celulele analizate telomerele tuturor brațelor au prezentat împerecheri ectopice. Rezultatele indică faptul că, expresia unui spectru larg de restructurări cromozomale somatice

observate la larvele din Santena, dar nu și la cele din Corio, poate fi corelată cu concentrația genotoxică a agenților de poluare din sedimentele Râului Bama. Această ipoteză este legată de descoperirea că în larvele colectate din zone poluate cu metale grele, frecvența restructurărilor somatice a fost semnificativ mai ridicată comparativ cu controlul.

Împerecherile ectopice dintre omologii cromozomului G au fost semnalate la *Chironomus balatonicus* recoltat de la Cernobil în perioada ce a urmat accidentului nuclear (Michailova și Petrova, 1991, Petrova, 1991), dar și la materialul biologic colectat din Râul Po (Italia), poluat cu metale grele (Michailova și colab., 1996) precum și la cel prelevat din habitate din nordul Italiei, la specia *Chironomus bernensis* (Petrova și Michailova, 2002).

Aceste rezultate confirmă ipoteza activării elementelor mobile ale genomului sub acțiunea unor agenți mutageni declanșatori ai instabilității genomice. Acestea pot indica rolul elementelor mobile în acest proces. Împerecherea cromozomilor la nivelul telomerelor promovează transferul elementelor mobile de la un cromozom la altul și perturbarea activității funcționale a întregului genom (Michailova și colab., 2009). Metalele grele acționează asupra cromozomilor politeni la nivel structural și funcțional încă de la începutul procesului de politenizare. Aberațiile cromozomale cuprind inversii, deleții, translocații, desinapsii. Aberațiile funcționale specifice sunt corelate cu modificări ale activității transcripționale ale inelelor Balbiani și RON, adică asupra structurilor importante pentru dezvoltarea larvară normală. Procesele de deleție pot duce la formarea cromozomilor „pompon”.

Michailova și colaboratorii (2009) au studiat efectul cadmiului (Cd) și cromului (Cr) asupra genomurilor speciilor de *Chironomus plumosus* și *Chironomus bernensis*, care trăiesc în apele din sudul Poloniei, depistând la *Chironomus bernensis* 11 restructurări somatice diferite: două deficiențe, opt inversii paracentrice heterozigote și o ruptură cromatidică, iar la *Chironomus plumosus* zece restructurări somatice: nouă inversii simple și o deficiență, precum și un polimorfism genomic generat de prezența unui cromozom B suplimentar mic și foarte condensat, care a fost considerat marker al poluării de către Petrova și colaboratorii (2007).

De asemenea, restructurări ale cromozomilor politeni din glandele salivare de *Chironomus riparius* au fost analizate și de către Petrova și colaboratorii (2004), în două regiuni poluate cu metale grele din Bulgaria (satul Pancharevo) și Rusia (St. Petersburg). Cele mai importante modificări structurale au fost inversiile și delețiile somatice care au determinat apariția unei structuri de tip „pompon” a cromozomului IV G, o translocație heterozigotă între cromozomii IV G și III F, mărirea discurilor individuale și apariția unui bloc de heterocromatină în apropierea centromerului cromozomului IV G. Au fost evidențiate, de asemenea, modificări în activitatea funcțională a RON și a inelelor Balbiani (BRc/BRb). Cele mai frecvente modificări structurale au fost inversiile somatice paracentrice și pericentrice heterozigote, deleția somatică a regiunii ALc-c din cromozomul G și un bloc de heterocromatină în apropierea centromerului cromozomului G, în populația din Bulgaria. În populația din Rusia au fost depistate inversii paracentrice heterozigote, o translocație intercromozomală heterozigotă și o deleție homozigotă a lui BRb.

Blaglocen (1964) a evidențiat în populațiile de *Chironomus* sp. care trăiesc într-un mediu acvatic contaminat cu deșeuri radioactive zece inversii și o deleție. Alterarea genetică este indusă în populațiile de *Chironomidae* de către o iradiere cronică de nivel scăzut a mediului înconjurător. De asemenea, împerecherile ectopice dintre omologii cromozomului G au fost semnalate la *Chironomus balatonicus* recoltat de la Cernobil, ulterior accidentului nuclear din anul 1986 (Michailova și Petrova, 1991).

Slizynski (1950), pe de o parte, și Keyl (1958, 1962), pe de altă parte, au tratat cu radiații X în doză mică embrioni de *Drosophila* și *Chironomus* și au observat o deleție structurală parțială în cromozomul G la *Chironomus*. Speciile genului *Chironomus* prezintă plasticitate ecologică și habitează în zone acvatice variate ca ecologie și poluare, însă genomul său prezintă o sensibilitate ridicată la condițiile mediului înconjurător neobișnuit pentru specie și în special la concentrații ridicate ale metalelor grele din substrat sau la radiații. S-a ajuns la concluzia că *Chironomus plumosus* poate fi utilizat ca indicator biologic al poluării antropogene a apei și a sedimentelor bente (Petrova și colab., 2004).

Există populații de *Chironomidae*, în mediu nepoluat, care prezintă anumite modificări structurale ale cromozomilor, acest aspect fiind explicat de către Ladeveze și colaboratorii (1988) prin faptul că elementele transpozabile și cele repetitive sunt implicate în inducerea spontană a remanierilor cromozomale în populațiile naturale. Punctele de rupere ale inversiilor se pot produce la situsurile de inserție ale transpozozonilor. Michailova și colaboratorii (1996) au emis ipoteza că la *Chironomus riparius* poate să existe o coincidență între distribuția la nivel cromozomal a unor elemente ADN mobile și repetitive și anumite situsuri ale punctelor cromozomale de rupere.

Din această cauză este obligatorie prelucrarea statistică a datelor referitoare la frecvența apariției aberațiilor cromozomale în mediu poluat, comparativ cu incidența apariției unor asemenea restructurări cromozomale în habitate nepoluate. Incidența mai mare a aberațiilor cromozomale înregistrată în habitatele poluate devine o dovadă peremptorie în aprecierea efectului agentului poluant asupra materialului genetic.

În România, cu studiul cromozomilor politeni s-au ocupat Ioan Steopoe și Lucian Gavrilă, de la Facultatea de Biologie, Universitatea din București, aceștia realizând observații citologice/citogenetice, la diferite specii de diptere.

În țara noastră, studii privind fenotipurile cromozomale la *Chironomus* au fost realizate în ultimul timp de Lucian Gavrilă și colaboratorii săi Liliana Burlibașa, Maria Daniela Ușurelu, Irina Radu, Laura Monica Magdalena, Aurel Ardelean, Marian Cărăbaș și Ioana Macovei (2008, 2009) de la Institutul de Genetică – Universitatea din București. Pe plan mondial sunt de referință studiile efectuate de: Golygina și colaboratorii (2001) și Michailova și colaboratorii (2009).

Spre deosebire de studiile efectuate la *Chironomus*, studiile privind fenotipurile cromozomale care au fost realizate la *Rhagoletis cerasi* sunt mult mai puține, pe plan mondial și aproape inexistente în România. Totuși, asemenea studii au fost inițiate și la noi de Lucian Gavrilă (1983). Recent, complementul cromozomal politen al speciei *Rhagoletis cerasi* a fost studiat de Kounatidis și colaboratorii (2008), care au demonstrat că acesta este alcătuit din zece brațe politene derivate din complementul cromozomal diploid $2n=8$.

2. PROBLEMELE PE CARE LE REZOLVĂ INVENȚIA:

Invenția pune la dispoziția Inspectoratelor Județene de Protecția Mediului, precum și altor organizații neguvernamentale de profil un mijloc fezabil, necostisitor și rapid de apreciere a sănătății mediului înconjurător prin cuantificarea restructurărilor (remanieri, aberații) cromozomale provocate de prezența în mediu a unor compuși poluanți, ca urmare a utilizării pesticidelor în combaterea chimică a pestelor, sau a exploatării de minereuri radioactive sau metalifere (în special cele cu metale grele, precum plumbul și cadmiul).

Până în prezent, în România, aprecierea efectelor poluării mediului înconjurător s-a realizat considerându-se prioritar efectele agenților poluanți asupra unor indicatori biologici grosieri, precum modificările morfologice (efectele teratologice asupra diferitelor organe ale speciilor). Numai că, asemenea efecte teratologice pot fi de natură plesiomorfă, adică induse ca urmare a acțiunii unor factori mezologici nemutageni, precum modificările climatice rapide, astfel că relevanța lor devine discutabilă. Analiza bazată doar pe asemenea modificări morfologice creează confuzie și nu conduce la identificarea efectului primar al agentului poluant.

Metodologia propusă de invenția noastră permite identificarea cauzelor primare ale modificărilor produse în organismele vii sub impactul poluării, deoarece asigură decelarea efectelor acestora asupra materialului genetic, în care este stocată informația ereditară ce dirijează realizarea tuturor trăsăturilor unui organism, putându-se realiza chiar și prognoza efectelor biologice ale poluanților cu mult înainte ca acestea să devină manifeste ca trăsături anormale morfo-anatomice.

Metodologia promovată de acest brevet are la bază ample cercetări experimentale care au vizat identificarea remanierilor cromozomale din cromozomii politeni ai larvelor de diptere apărute spontan în natură la diferite specii, fie prin mobilizarea elementelor genetice mobile (transpozoni), fie sub acțiunea infecțiilor virale sau de altă natură. Aceste cercetări au fost inițiate de Gavrilă și colaboratorii, acum două decenii, aceștia identificând în glandele salivare de *Chironomus plumosus* un virus specific de tip *Pox-like*, corelat cu prezența unor restructurări cromozomale distincte față de cele înregistrate în condiții de poluare (Mihăescu Gr., Gavrilă L., Mișcalencu D. - *A Pox virus in the salivary glands of Chironomus plumosus*, Rev. Roum. Biol., Biol. Anim. 33(1), 1988).

Invenția poate fi aplicată, în condiții de teren și de laborator, cu costuri minimale și cu pregătirea rapidă a celor care o utilizează (cercetători sau tehnicieni, chiar absolvenți de liceu) ceea ce oferă rezolvarea și a unor probleme de utilizare a forței de muncă pe plan local.

Eficiența metodologiei a fost stabilită pe baza următoarelor criterii:

1. Repetabilitatea

Estimarea frecvenței aberațiilor cromozomale la nivelul cromozomilor politeni a permis să se constate existența unor diferențe relevante ale acestora în regiunile nepoluate (de ex. stațiunea Moneasa din jud. Arad) și zonele poluate radioactiv sau cu metale grele (Rănușa și Mureșul Mort, județul Arad, respectiv orașul Arad).

2. Asigurarea statistică

Analiza statistică a rezultatelor investigațiilor a permis identificarea unei diferențe asigurată statistic între frecvența remanierilor cromozomale în zonele nepoluate și frecvența acestora în zonele poluate.

3. Fezabilitatea și economicitatea

Metodologia poate fi implementată de IJPM-uri sau ONG-uri cu profil de mediu, cu costuri minimale și eforturi reduse de pregătire tehnică a personalului.

4. Sustinabilitatea în protecția mediului și ocrotirea biodiversității

Metodologia face uz de reactivi obișnuiți, netoxici care nu prezintă risc pentru utilizatori și nu au impact de mediu, fiind biodegradabili. Cantitatea utilizată este neglijabilă și nu pune probleme de costuri.

Materialul biologic utilizat nu afectează biodiversitatea, nu implică specii biologice amenințate cu extincția și nici nu ridică probleme de bioetică, de niciun fel.

5. Metodologia poate oferi dovezi peremptorii în litigii de mediu, având o potențială valoare echivalentă cu aceea a unei probe ADN.

Demonstrarea efectului agentului poluant asupra structurii cromozomilor politeni nu poate fi pusă sub semnul întrebării dacă metodologia este aplicată corect, putându-se realiza probatorii comparative asigurate statistic și cu imagistică concretă.

Avantajele invenției sunt de natură economică și credibilitate științifică și sunt următoarele:

1. repetabilitate și concretețe;
2. aduce dovezi directe privind afectarea materialului genetic, deținătorul planurilor arhitecturale ale tuturor trăsăturilor organismelor vii;
3. exclude implicările fals-pozitive, de natură plesiomorfă, demonstrând acțiunea nocivă a agentului poluant direct asupra materialului genetic;
4. asigură obținerea unor probe facile dar irefutabile, cu costuri materiale minime;
5. poate fi punct de pornire în realizarea unor demersuri antreprenoriale, cu utilizarea forței de muncă locală, cu rezonanță în politicile socio-economice ale Uniunii Europene.

3. DESCRIEREA PROTOCOALELOR:

3.1. Metoda de colorare rapidă cu carmin-acetic pentru studiul cromozomilor politeni

3.1.1. *Materiale necesare:*

Lame și lamele microscopice, ace spatulate, pensete, microscop optic, lupă binocular, hârtie de filtru, lămpi de spirt, carmin acetic, sticle de ceas pyrex.

3.1.2. *Material biologic:*

Larve de *Chironomus plumosus* în stadiile III și IV de dezvoltare, larve de *Rhagoletis cerasi* și *Mycetophila agarici*, în stadiul III de dezvoltare.

3.1.3. *Etapele lucrării:*

- se iau larvele de stadiu III sau IV care urmează să se transforme în pupă. Glandele salivare localizate în partea anterioară a corpului în imediata apropiere a ganglionului cerebroid sunt legate de armătura bucală care apare ca un punct negru, sub tegumentul transparent.

- larva este transferată pe o lamă microscopică, lângă o picătură de carmin-acetic după care, cu ajutorul unei pense, aceasta este immobilizată prin prinderea cu pensa de partea posterioară a corpului, iar cu un ac spatulat se face o incizie înapoia punctului negru ce reprezintă armătura bucală și, printr-o mișcare de smulgere se detașează această parte anterioară a corpului, recuperându-se doar glandele salivare care sunt introduse direct în picătura de carmin-acetic, în care stau 10-15 minute, înprospătându-se periodic carminul-acetic prin adăugarea de noi picături. Când glandele salivare au căpătat o culoare roșie-aprinsă spre negru se aplică o lamelă microscopică peste care se apasă ușor cu pensa, acul spatulat sau cu un băț de chibrit pentru a se realiza o etalare menajată a celulelor și cromozomilor, astfel încât să nu fie alterat, pe cât posibil, modelul nativ de bandare a cromozomilor politeni. Ulterior, cu o hârtie de filtru se îndepărtează excesul de colorant și se efectuează examinarea microscopică.

3.2. Metoda Feulgen

3.2.1. *Materiale necesare:* aceleași ca la 3.1.1. la care se adaugă alcool metilic absolut, acid acetic glacial, HCl 1N, reactiv Schiff (leucofuxină).

3.2.2. *Material biologic:* același ca la 3.1.2

3.2.3. Etapele de lucru:

I – Recoltarea probelor - Se folosesc larve de stadiul III – IV

Glandele salivare sunt dispuse în partea anterioară a corpului, înapoia armăturii bucale, ce apare ca un punct negru. Se imobilizează cu ajutorul unei pense larva pe o lamă microscopică și este vizualizată la lupa binocular. Vârful unui ac spatulat se așază înapoia armăturii bucale și se execută o mișcare de incizie, urmată de una de smulgere în direcție longitudinală față de corpul larvei. Odată cu îndepărtarea armăturii bucale vor fi extrase și glandele salivare care după o prealabilă spălare în apă distilată și apoi îndepărtare a excesului de lichid sunt introduse în amestecul fixator.

II – Fixarea glandelor salivare se realizează într-un amestec fixator 3:1, alcool metilic absolut: acid acetic glacial, la frigider (4°C), timp de 2-3 ore.

În fixator, celulele sunt omorâte, iar conținutul citoplasmatic este coagulat, pe când structurile nucleare sunt conservate.

III – Hidroliza

După ce a fost înlăturat amestecul fixator prin spălare a glandelor salivare în apă de robinet și apoi în apă distilată, se realizează hidroliza în HCl 1N, la 60°C, timp de 4 minute. Prin hidroliză este facilitat procesul de colorare a cromozomilor și apoi de etalare a celulelor pe lama microscopică.

IV – Colorarea

Materialul biologic scos din HCl 1N se introduce în apă distilată. Glandele salivare sunt apoi transferate pe o bucată de hârtie de filtru netedă entru deshidratare, după care sunt introduse în colorant. Acesta este reactivul Schiff sau leucofuxina.

Materialul se lasă în colorant peste noapte, la frigider sau este ținut câteva ore la temperatura camerei până ce capătă o culoare roșu-carmin.

V – Efectuarea preparatelor

Glanda salivară colorată este introdusă într-o picătură de carmin-acetic proaspăt preparat sau de apă acetică (acid acetic 45%), depusă pe o lamă microscopică. Peste materialul colorat se aplică o lamelă, care se presează ușor cu acul spatulat sau penseta și apoi cu ajutorul unei hârtii de filtru se absoarbe excesul de lichid.

Se poate utiliza pentru etalare și vârful unui băț de chibrit, cu care se bate ușor pentru a se realiza o strivire menajată care să prezerve modelul de benzi.

După uscare la aer, preparatul se analizează la microscop, cu obiectivul 40 sau cu obiectivul de imersie. Se recomandă să fie analizate câte 100 de celule de la 10 – 50 indivizi pentru fiecare habitat investigat.

4. REZULTATE:

Scopul acestui demers este identificarea anumitor markeri cromozomali relevanți care să poată fi utilizați pentru evaluarea efectelor poluării la nivel cromozomal, astfel încât în funcție de incidența și amploarea lor, să poată fi apreciată starea de sănătate a ecosistemelor din care au fost prelevate probele biologice.

În vederea atingerii acestui obiectiv, este analizată structura cromozomilor politeni în microscopie optică la speciile *Chironomus plumosus*, *Rhagoletis cerasi* și *Mycetophila agarici* în condiții de posibilă poluare chimică și radioactivă din zonă și rezultatele obținute în cercetarea

din laborator pot fi comparate cu rezultatele raportate, în literatura de specialitate, pentru zone nepoluate sau, după caz, pentru zone poluate.

Chironomidele oferă unul dintre cele mai bune modele pentru studierea diversității cromozomale în timpul divergenței populațiilor și speciilor, deoarece ele păstrează un mare grad de omologie în secvența benzilor cromozomale.

Prezența unui număr mare de benzi la *Chironomus* oferă o mare densitate de markeri de-a lungul cromozomilor, care face din aceste insecte un model experimental foarte util în investigarea evoluției și dinamicii genomului (Gunderina și colab., 2005). Se poate urmări și efectul diferiților factori interni și externi asupra funcționării genelor.

În cromozomii politeni ai speciilor din genul *Chironomus* modelul de benzi este înalt reproductibil și caracteristic fiecărei specii și poate oferi posibilitatea detecției diferitelor aberații cromozomale (inversii, deleții, duplicații, translocații), deoarece aceste aberații afectează sinapsa somatică a cromozomilor omologi, nemaifiind posibilă o împerechere normală a acestora.

Orice modificare în structura cromozomilor politeni de la *Chironomus* duce la apariția unor alterări ale împerecherii somatice exprimate sub forma unor bucle, la nivelul cărora se poate observa starea duplicată a brațelor cromozomale, care reprezintă un excelent sistem de studiu al rearanjamentelor cromozomale ce se constituie în genosenzori pentru aprecierea sănătății mediului ambiant și evidențierea efectelor nocive ale alterării acesteia ca urmare a poluării sau a intervenției unor condiții meteorologice anormale (șocuri termice, de exemplu).

Gavrila și colaboratorii (2003) consideră cromozomii politeni structuri prin excelență funcționale care asigură sinteza într-un timp foarte scurt a unor produși necesari într-o cantitate foarte mare, spre a fi realizată transformarea larvei în pupă. După ce are loc sinteza acestor produși, celulele care produc asemenea sinteză suferă procesul de autoliză. Celulele glandelor salivare ale adultului care prezintă cromozomii obișnuiți nu provin din celulele glandelor salivare, ci din celulele discurilor imaginale care sunt determinate și apoi suferă mecanismul complex al diferențierii structural funcționale, în timpul proceselor de histoliză și histogeneză din stadiul nimfal. Astfel, după ce au realizat o sinteză intensă, cromozomii politeni se dezintegrează, ei neputând realiza transmiterea informației lor ereditare în descendență. Ca atare, aceștia sunt, prin excelență, structuri funcționale tranziente, prin care ADN își manifestă în exclusivitate funcția heterocatalitică ce dirijează sinteza unor proteine specifice cerute celulei într-o cantitate mare și într-un timp foarte scurt, ceea ce este însă esențial în derularea programului de metamorfoză a insectei. Această cerință nu poate fi îndeplinită decât prin adoptarea politeniei (fig. 1).

O remaniere cromozomală este considerată *ereditară* atunci când afectează celulele ambelor glande salivare ale unuia și aceluiași individ și *somatică*, atunci când într-o glandă salivară există nucleii în care se află acea remaniere cât și nucleii în care nu este prezentă asemenea remaniere cromozomală. Restructurările cromozomale somatice se produc în timpul fazelor embrionare timpurii (înainte de instalarea politenizării), în timp ce restructurările cromatidice se produc când agentul poluant a acționat după ce procesul de politenizare a început (Michailova și colab., 2000).

Alterările ereditare sunt exprimate prin polimorfismul cromozomal al speciilor și au valoare selectivă diferită în funcție de componentele mediului din zonele investigate, iar frecvența restructurărilor cromozomale este semnificativ mai ridicată la exemplarele colectate din zonele poluate, comparativ cu zonele nepoluate. Au fost identificate diferite remanieri reprezentate prin inversii, deleții, translocații, desinapsii, împerecheri ectopice și aneuploidii;

majoritatea punctelor de rupere din cadrul remanierilor au fost identificate de o parte și de alta a centromerului, unde se află localizată heterocromatina constitutivă. În anumite regiuni puternic industrializate ale Italiei, s-a observat că larvele de *Chironomus plumosus* prezintă o variabilitate crescută a activității de transcripție a cromozomilor politeni, precum și numeroase rearanjamente structurale în cromozomul G, dar și diverse tipuri de aberații cromozomale somatice și ereditare (Michailova și colab., 1998).

În investigațiile noastre recente (Gavrilă și colab., 2008, 2009) au fost studiate aspectele de fenotip cromozomal cu referire specială la restructurările cromozomale din cromozomii politeni de *Chironomus plumosus*, din habitate poluate, din județul Arad, evidențiindu-se o incidență mare a remanierilor cromozomale în condiții de poluare comparativ cu zonele nepoluate (fig. 2).

Analiza statistică a datelor obținute privind frecvența aberațiilor cromozomale la *Chironomus plumosus* a fost realizată pe 100 de complemente cromozomale politene la câte 35 de indivizi, pentru fiecare dintre cele trei populații, din două zone poluate reprezentate de Canalul Mureșul Mort din Arad și localitatea Rănușa, având ca martor o populație dintr-un habitat nepoluat aflat în localitatea Lipova (tabele nr. 1-3, grafice nr. 1-3).

Există diferențe în ceea ce privește incidența și spectrul modificărilor cromozomale între control (martor) și zonele poluate, dar și între cele două zone poluate. Aceste diferențe pot fi explicate prin numeroși factori, incluzând concentrațiile diferite ale metalelor grele și ale compușilor acestora intensitatea (doza) radiațiilor, iar pe de altă parte prin diferențele specifice condițiilor de viață pentru fiecare biotop studiat, precum și stadiul fiziologic al organismului în care agentul poluant a acționat.

În plus față de restructurările cromozomale, în populațiile de *Chironomus plumosus*, studiate din județul Arad au fost identificate și mutații genomice reprezentate prin aneuploidii (monosomie, trisomie) ce afectează perechea a IV-a de cromozomi, precum și prezența unui număr variabil de cromozomi supranumerari, desemnați cromozomi B. Se știe că natura cromozomilor B este prin excelență heterocromatică. Ei au însă un rol important, afectând plasticitatea genomului și conferind individului purtător elasticitate adaptivă la variația condițiilor de mediu.

O posibilă monosomie a celei de a IV-a perechi a complementului cromozomal politen de *Chironomus plumosus* a fost întâlnită ocazional (fig. 3) în câteva celule ale aceleiași glande salivare în care trisomia acestei perechi a fost de asemenea identificată, sugerând că în dezvoltarea embrionară timpurie a acestui individ s-a produs un fenomen de non-disjuncție mitotică (prin eșuarea diviziunii centromerului) în mitozele ce au precedat intrarea celulei în endociclu politenic în unul dintre cei doi cromozomi omologi ai celei de a IV-a perechi de cromozomi. Acest lucru determină apariția a două linii celulare aneuploide, una cu trisomie ($2n+1$), cealaltă cu monosomie ($2n-1$), pentru această pereche cromozomală. Înseamnă că glanda salivară a larvei a fost un amestec (mozaic) de celule normale disomice ($2n$), trisomice ($2n+1$) și monosomice ($2n-1$) care a condus la existența de celule cu 4, 5 și, respectiv 3 cromozomi politeni în glandele salivare, variația afectând cel de-al patrulea (IV) cromozom, cel mai scurt al complementului.

În aceeași celulă cu monosomia celei de a IV-a perechi de cromozomi (fig. 3) a fost identificat un rearanjament cromozomal complex în cromozomul politen III care prezintă desinapsia brațului său scurt ce apare ca o bifurcație între ramurile căreia se află un corp heterocromatic vizibil, masiv, care nu prezintă un model evident de bandare. Aceasta poate

reprezenta o translocatie a unui cromozom B atipic. S-a semnalat și desinapsia regiunii terminale a brațului lung al cromozomilor politeni I și III. Aceste aspecte ale fenotipului cromozomal ar putea sugera existența unor dereglări semnificative la nivelul proceselor sinaptice somatice exprimate la nivelul întregului genom, adică un caz tipic de „zgomot” citogenetic, generator de instabilitate cromozomală și de dinamică genomică, „zgomot” ce poate fi amplificat sub incidența poluării mediului ambiant.

La larvele de *Chironomus plumosus* colectate și analizate din Canalul Mureșul Mort din Arad (ce reprezintă o deviație a Canalului Mureșel, care își evacuează apele în Mureș), în care sunt concentrații ridicate de metale grele, au fost evidențiate numeroase aberații cromozomale de tipul inversiilor, delețiilor, translocațiilor, împerecherilor ectopice și desinapsiilor.

Activitatea cromozomală specială de pufare întâlnită la unele larve de *Chironomus plumosus* din Canalul Mureșul Mort pare a se datora acțiunii plumbului, fapt demonstrat și în cercetările efectuate de Michailova și colaboratorii (2001, 2006), care au tratat experimental, în laborator, larve de *Chironomus* cu compuși ai plumbului obținând rezultate comparabile.

De asemenea, aplicându-se un tratament cronic cu metale precum cromul, aluminiul și plumbul, s-a constatat o creștere semnificativă a frecvenței delețiilor la nivelul cromozomului G (Michailova și colab., 2006). Numeroase deleții au fost identificate și în cromozomii politeni ai larvelor de *Chironomus plumosus* din habitatele arădene poluate cu metale grele.

Modificările observate în activitatea inelelor Balbiani și a regiunii organizator nucleolare pot fi puse pe seama toxicității cronice a cuprului asupra larvelor de *Chironomus plumosus*, fenomen descris și în literatura de specialitate (Aziz și colab., 1991). În cadrul studiilor realizate la *Chironomus plumosus* prelevat din sedimentele din Canalul Mureșul Mort au fost identificate 17 restructurări cromozomale somatice diferite dintre care: trei inversii, cinci deleții, două translocații și șapte desinapsii precum și aneuploidii reprezentate printr-o trisomie, observându-se și prezența unor cromozomi supranumerari B.

În afară de restructurările cromozomale identificate în populațiile studiate, cercetările efectuate evidențiază pentru prima dată în România existența în populațiile de *Chironomus plumosus* din zona Arad a unor mutații genomice, la nivelul complementului cromozomal politen reprezentate prin aneuploidii de tipul monosomiei și trisomiei ce afectează perechea a IV-a de cromozomi.

Un alt fenomen interesant este reprezentat de prezența unor cromozomi supranumerari desemnați cromozomi B, la specia *Chironomus plumosus*. Acești cromozomi au un rol important afectând plasticitatea genomului și conferind indivizilor purtători elasticitate adaptativă la variația condițiilor de mediu. Numărul lor variază și în funcție de condițiile de mediu extern, putând fi în sine un genosenzor sensibil, indicator de poluare.

În populațiile studiate de *Chironomus plumosus* colectate din canalul Mureșul Mort din Arad, a fost frecvent observată o reducere dramatică a celui de-al treilea inel Balbiani BRc₃, simultan cu expansiunea inelului BRa₁ (organizator nucleolar NO) de la nivelul cromozomului politen IV. Inelele Balbiani sunt pufe active care codifică pentru polipeptidele principale legate de tranziția stadiului de larvă spre pupă din metamorfoza insectei. În ecosistemele nepoluate cele trei inele Balbiani Bra₁, BRb₂ și BRc₃, sunt în general egale ca mărime.

La larvele de *Chironomus plumosus* colectate din sedimentele poluate radioactiv din localitatea Rănușa au fost evidențiate următoarele remanieri cromozomale: șase inversii, șase deleții, trei translocații, 12 desinapsii și o împerechere ectopică. De asemenea, au fost identificate două trisomii, o monosomie precum și cromozomii supranumerari B.

Prin colorația *DAPI* a fost evidențiată în populația de *Chironomus plumosus* colectată din localitatea Rănușa (jud. Arad), pufarea telomerică a cromozomului III care demonstrează o posibilă activare a genelor de tip HS (de la *heat shock* = *gene de șoc termic*), care sunt activate în condiții specifice. În cazul de față o gamă largă de condiții stresante este capabilă de a mima efectul șocului termic asupra expresiei genice, reprezentând un exemplu atipic de „*fenocopie*”. Este posibil ca metalele grele și radionuclizii din minele de uraniu care poluează zona respectivă să acționeze ca inductori ai structurii expandate de tip inel Ballbiani, la nivelul telomerei, din brațul drept al cromozomului III, un fenomen similar cu răspunsul la șoc termic.

Studiul structurii cromozomilor politeni cu ajutorul microscopului optic la specia *Chironomus plumosus* a scos în evidență lipsa etapei de formare a cromocentrului, brațele cromozomale fiind independente. La această specie, fiecare cromozom face sinapsă cu omologul său, după care suferă procesul de politenizare, pe când la *Rhagoletis cerasi* și *Mycetophila agarici*, organizarea complementului cromozomal politen este realizată după modelul *Drosophila*, cu formarea prealabilă a unui cromocentru, după care are loc desfășurarea endociclului politen.

În urma aplicării tehnicii de colorare clasică și a procedurii menajate *squash*, a putut fi menținut modelul nativ de bandare cromozomală în cromozomii politeni, fiind astfel posibilă identificarea diferitelor rearanjamente cromozomale. La *Chironomus plumosus*, la unele larve, poate fi observat un singur tip de restructurare cromozomală, fie într-un singur cromozom sau în mai mulți cromozomi. La alte larve au putut fi observate multiple rearanjamente cromozomale în complementul cromozomal politen, fie în același cromozom sau în cromozomi diferiți. Studiile realizate la acest dipter, mai ales în zonele critice sub aspectul poluării cu diverși poluanți radioactivi și cu metale grele din județul Arad au scos în evidență mai multe tipuri de restructurări cromozomale, printre care inversii, deleții, translocații, desinapsii și împerecheri ectopice, precum și existența aneuploizilor reprezentați prin monosomie și trisomie. Acest spectru larg de remanieri cromozomale poate fi explicat prin faptul că larvele de *Chironomus plumosus* sunt foarte active metabolic și genomul lor se dovedește a fi extrem de sensibil la factorii de stres din mediu, mai ales la substanțele poluante.

Investigațiile efectuate la specia *Rhagoletis cerasi* au permis evidențierea faptului că, în glandele salivare, cromozomii politeni prezintă de-a lungul brațelor lor grade diferite de politenizare, regiunile subreplicate (uneori foarte extinse) alternând cu regiunile replicate normal.

Subreplicarea unor sectoare extinse ale genomului dintr-un nucleu face ca acesta să prezinte un grad de complexitate mult mai mare decât cel întâlnit acolo unde a avut loc o replicare normală a cromozomului. În nucleul politen nu se poate atinge gradul de condensare din nucleul celulei mitotice, iar acest fapt face ca în nucleul politen de la *Rhagoletis cerasi* regiunile necondensate ale unor cromozomi să se poată atinge ușor de ale altor cromozomi, dând un aspect general reticulat al nucleului politen cu zone decondensate și zone puternic condensate, în care fibra de cromatină este organizată după modelul politen cu benzi și interbenzi. Un asemenea mozaic de fibre de cromatină din nucleul politen cu o condensare neuniformă a fibrelor de cromatină și cu alternanță de regiuni extrarePLICATE și sectoare normal replicate sau subreplicate ar produce mari probleme în repartizarea echilibrată a materialului genetic dacă nucleul politen s-ar divide.

După Gavrilă și colaboratorii (2003) o asemenea arhitectură cromozomală care este bazată pe condensare neuniformă ar predispuce celula la o repartizare neechilibrată a genelor în nucleii-fii, ceea ce ar compromite funcționarea normală a celulei, punând sub semnul întrebării

existența sistemului. Autorii consideră că poate aceasta este și logica pentru care celulele cu nuclei politeni nu se mai divid, după ce au canalizat macazul nuclear spre endociclul politen și de aici spre calea apoptozei.

La *Rhagoletis cerasi*, ansamblul cromozomilor politeni se prezintă sub un aranjament complex care poate fi interpretat ca rezultat al unei asocieri a cromozomilor cu membrana internă a anvelopei nucleare, cu realizarea de conective intercromozomale și în consecință cu constituirea unor structuri supracromozomale de tip circular cu numeroase ramificații.

Arhitectura nucleului politen la *Rhagoletis cerasi* și neuniformitatea condensării inițiale înainte de producerea rundelor succesive de replicare permit realizarea unor contacte între regiuni mai îndepărtate ale aceluiași cromozom sau între cromozomi diferiți prin fibre care nu sunt supuse politenizării. Aceste contacte sunt baza împerecherii ectopice în sistemele politenice. Pe lângă modelul caracteristic de bandare, cromozomii politeni de la *Rhagoletis cerasi* mai pot prezenta ca aspecte specifice de fenotip cromozomal regiuni de despiralizare ale benzilor unele mai limitate – pufuri, altele mai extinse – inele Balbiani.

Un spectru larg de restructurări cromozomale poate fi întâlnit și în cromozomii politeni de la *Rhagoletis cerasi* (fig. 4, 5). Cele mai multe sunt reprezentate de bucle de desinapsie, bucle de inversie interstițiale, subterminale sau terminale.

În figura 6 pot fi observate bucle de inversie în brațul unui cromozom politen la *Rhagoletis cerasi*, iar în figura 7, un inel de inversie în brațul unui cromozom politen al aceleiași specii. Uneori restructurările pot fi deosebit de complexe, reprezentând figuri în opt, figuri *hairpin* sau bifurcații, geneza lor fiind greu de explicat. Gavrilă și colaboratorii (2003) explică prezența acestora datorită intervenției probabile a elementelor genetice mobile (transpozoni) și asincroniei intracromozomale și, mai ales, intercromozomale, în sinteza ADN din derularea ciclurilor endomitotice ale politenizării.

Investigațiile efectuate la microscopul optic la specia *Rhagoletis cerasi* au permis evidențierea faptului că în glandele salivare cromozomii politeni prezintă de-a lungul brațelor grade diferite de politenizare; regiunile subreplicate pot fi uneori limitate, altele extinse. De asemenea, cromozomii politeni de la *Rhagoletis cerasi*, spre deosebire de cei de la *Chironomus plumosus*, sunt organizați în maniera celor de la *Drosophila melanogaster*, cu heterocromatina pericentromerică asociată în cromocentru.

Analiza statistică a datelor obținute privind frecvența aberațiilor cromozomale la specia *Rhagoletis cerasi* a fost realizată pe 100 componente cromozomale, la câte 35 de indivizi, pentru fiecare din cele trei populații, din două zone poluate radioactiv reprezentate de localitatea Rănușa și localitatea Bîrzava și o populație dintr-o zonă nepoluată aflată în localitatea Lipova (tabele nr. 4-6, grafice nr. 4-6).

Analiza datelor prezentate, în tabelul 4 și în graficul 4, permite a fi evidențiat faptul că în zona poluată radioactiv Rănușa sunt întâlnite cele mai multe tipuri de rearanjamente cromozomale: trei inversii, două deleții, o translocatie și trei desinapsii. Urmează apoi zona mai puțin poluată radioactiv Bîrzava, cu două inversii, o deleție și o desinapsie. A fost identificată și o inversie în zona de control nesupusă factorilor poluării, semn al existenței în genomul acestei insecte a unor elemente transpozabile care asigură prin mobilizarea lor intragenomică o anumită dinamică genomică, instabilitatea acesteia fiind augmentată la interferența cu factorii poluanți.

Pentru obiectivizarea concluziilor, certitudinea unor investigații riguroase și justetea deciziilor se impune cu necesitate realizarea unor cercetări comparative în zone control/martor

(nepoluate) versus zone de impact ecologic (poluate), precum și prelucrarea statistică a datelor obținute.

Spre deosebire de *Rhagoletis cerasi* și, mai ales de *Chironomus plumosus*, studiile privind cromozomii politeni la specia *Mycetophila agarici* ($2n=8$) sunt puține. Complementul cromozomal politen la această specie este ca și la *Rhagoletis cerasi* de tip *Drosophila*, organizarea acestuia fiind întâlnită, după cum am putut remarca la speciile de diptere în care etapa larvală a metamorfozei este desfășurată în alte medii decât cel acvatic. De asemenea, poate fi evidențiată o structură particulară a telomerelor în care dispare pattern-ul de benzi care este înlocuit cu fibre de cromatină sub formă de bucle care au un traiect perpendicular pe axul lung al cromozomului.

La *Mycetophila agarici* a fost evidențiată asimetria unor regiuni despiralizate (pufe) ale cromomerelor. Analiza complementului cromozomal politen la această specie permite evidențierea unor multiple restructurări cromozomale (fig. 8, 9), urmare a alterării omologiei cromozomilor din perechile de cromozomi și grație realizării sinapsei somatice a acestora.

Dintre restructurările cele mai importante observate în cromozomii politeni la *Mycetophila agarici*, pot fi menționate inelele sau buclele de inversie (fig. 10). Au fost identificate și alte aspecte interesante de organizare celulară a materialului genetic cum ar fi o posibilă organizare supracromozomală, precum și o organizare a cromozomilor politeni pe prezumtive domenii cromozomale.

Structura cromozomilor politeni ai larvelor speciei *Mycetophila agarici* arată că organizarea complementului cromozomal politen este realizată, ca și la *Rhagoletis cerasi*, după modelul *Drosophila*, cu formarea unui cromocentru. A fost evidențiată o structură particulară a telomerelor în care pattern-ul de benzi este înlocuit cu fibre de cromatină dispuse sub formă de bucle cu un traiect perpendicular pe axul lung al cromozomului.

La *Mycetophila agarici*, în cromozomii politeni apar pufuri cu specificitate de stadiu de dezvoltare larvală și cu o distribuție caracteristică fiecărui braț cromozomal.

Un lucru foarte interesant apare în celulele aflate în stadii avansate de apoptoză, în care modelul de bandare este modificat, păstrându-se doar unele zone heterocromatice fragmentate sau blocuri mari de heterocromatină rezultate prin confluarea sectoarelor heterocromatice în urma hidrolizei mai rapide a zonelor eucromatice.

Folosind larve de stadiul III-IV, de *Chironomus plumosus*, *Rhagoletis cerasi* și *Mycetophila agarici* în investigațiile efectuate în scopul de a găsi anumiți genosenzori relevanți și folositori pentru evaluarea stării de sănătate a mediului înconjurător, se poate concluziona că aceste specii (în mod special *Chironomus plumosus*) pot fi un model de bază pentru studierea genosenzorilor în vederea estimării efectelor poluării mediului înconjurător asupra sistemelor vii și asupra dinamicii genomului celulelor eucariote.

În afară de restructurările cromozomale au fost luate în considerare și alte aspecte fenotipice ale cromozomilor politeni incluzând funcția organizator nucleolară, replicarea diferențiată și amplificarea genelor ribozomale din regiunile organizator - nucleolare drept elemente potențiale cu valoare de genosenzor.

Investigațiile citologice cu ajutorul microscopului optic, prin tehnica clasică de colorare a cromozomilor efectuate la speciile *Chironomus plumosus*, *Rhagoletis cerasi* și *Mycetophila agarici*, aparținând ordinului *Diptera*, din zona Arad, au permis evidențierea unor aspecte interesante legate de organizarea și funcționarea cromozomilor politeni. Studiile realizate pe aceste specii (îndeosebi la *Chironomus plumosus*), mai ales, în zonele critice, sub aspectul

poluării cu diverși poluanți radioactivi și metale grele din zona Arad au scos în evidență o gamă variată de restructurări cromozomale printre care: inversii, deleții, translocații, desinapsii și împerecheri ectopice ce pot fi considerate a avea valoare de genosenzori în reacția sistemelor biologice la efectele poluării mediului.

Analiza citogenetică a acestor specii de diptere permite identificarea în cromozomii lor politeni a unor noi elemente de fenotip cromozomal și a unor restructurări cromozomale cărora li se poate conferi valența unor genosenzori în evaluarea efectelor poluării mediului înconjurător.

Analiza statistică a frecvenței aberațiilor cromozomale la specia *Mycetophila agarici*, ca și în cazul speciei *Rhagoletis cerasi* a fost realizată pe 100 de complemente cromozomale politene, la câte 35 de indivizi pentru fiecare din cele trei populații din două zone poluate radioactiv (Rănușa și Bîrzava) și o populație dintr-o zonă nepoluată aflată în localitatea Lipova (tabele nr. 7-9, grafice nr. 7-9).

La *Mycetophila agarici* numărul modificărilor cromozomale este mult mai mic față de celelalte două specii, dar, ca și în cazul lor cele mai multe aberații cromozomale, au fost întâlnite la populația studiată de la Rănușa, unde au fost depistate două inversii, o deleție și trei desinapsii. La Bîrzava, cea mai frecventă remaniere cromozomală este inversia paracentrică (interstițială), pe când în zona de control, desinapsia este restructurarea cel mai des întâlnită, aceasta reflectând, probabil, funcționarea transpoziției elementelor genetice mobile.

5. CONCLUZII GENERALE:

1. Brevetul propune abordarea analizei impactului poluării mediului înconjurător prin identificarea unor modificări ale structurii și funcționării materialului genetic sub influența diferiților agenți poluanți, luându-se spre exemplificare efectul radioactivității artificiale și efectul ionilor metalelor grele.
2. Având în vedere aplicarea sa pe scară largă, cu costuri minimale, autorii au imaginat identificarea unor genosenzori relevanți, ușor de evidențiat în condiții de teren sau de laborator modest dotat cu aparatură și reactivi, care nu presupune costuri majore în întreținerea și funcționarea sa, operațiunile putând fi asumate de către un personal cu pregătire medie (laboranți, tehnicieni) sub supravegherea unui licențiat în biologie sau ecologie.
3. Genosenzorii utilizați în aprecierea efectelor agenților poluanți cu efect mutagen/clastogen sunt reprezentați de restructurările cromozomilor politeni din celulele glandelor salivare ale larvelor de diptere întâlnite ubicvitar în ape (*Chironomus plumosus*, *Anopheles* sp.), pe sol (*Mycetophila agarici*) sau în părțile inferioare ale atmosferei (*Rhagoletis cerasi*) astfel ca să fie posibilă identificarea efectelor poluării tuturor mediilor de viață (aer, apă, sol).
4. Materialul biologic ce urmează a fi analizat nu ridică niciun fel de probleme de bioetică sau de protecție specială pentru specii aflate pe liste speciale pentru specii amenințate cu extincția sau specii rare, endemisme etc.
5. Costurile de implementare a brevetului sunt minimale, atât pentru componenta dotarea materială, cât și pentru componenta resurse umane, brevetul putând rezolva multe aspecte legate de protecția mediului înconjurător, crearea unei rețele naționale de monitoring ecologic, accesarea finanțării comunitare și a fondurilor europene precum și utilizarea forței de muncă locale și a reorientării profesionale.

REVENDICĂRI

Investigațiile citologice cu ajutorul microscopului optic prin tehnica clasică de colorare a cromozomilor efectuate la speciile *Chironomus plumosus*, *Rhagoletis cerasi* și *Mycetophila agarici* aparținând ordinului *Diptera* din zona Arad au permis evidențierea unor aspecte interesante legate de organizarea și funcționarea cromozomilor politeni ce pot fi utilizate ca genosenzori în aprecierea gradului de poluare a mediului înconjurător. Studiile realizate pe aceste specii (în special *Chironomus plumosus*), mai ales în zonele critice sub aspectul poluării cu diverși poluanți radioactivi și metale grele din zona Arad au scos în evidență o gamă variată de restructurări cromozomale printre care: inversii, deleții, translocații, desinapsii și împerecheri ectopice. Aceste rearanjamente cromozomale au fost fotografiate și descrise pentru prima dată în literatura de specialitate din România.

În afară de restructurările cromozomale identificate în populațiile studiate de *Diptere*, cercetările efectuate evidențiază pentru prima dată în România existența în populațiile de *Chironomus plumosus* din zona Arad a unor mutații genomice la nivelul complementului cromozomal politen reprezentate prin aneuploidii de tipul monosomiei și trisomiei ce afectează perechea a IV-a de cromozomi.

Un alt fenomen interesant și descris îl reprezintă prezența în număr variabil a cromozomilor supranumerari (cromozomi B), la specia *Chironomus plumosus*, care au un rol important afectând plasticitatea genomului și conferind indivizilor purtători elasticitate adaptativă la variația condițiilor de mediu.

Se revendică originalitatea ideii utilizării tipurilor și frecvenței aberațiilor cromozomale din sistemul politen ca genosenzori în aprecierea stării de sănătate a mediului.

Metodologia propusă în prezenta cerere de brevet este caracterizată de fezabilitate, costuri reduse și o dotare materială minimală. Cercetările noastre realizate în laborator utilizând microscopia electronică TEM și microscopia de fluorescență, prin colorație DAPI ne-au permis să evidențiem structura fină a cromozomilor politeni, precum și numeroase restructurări cromozomale, dar asemenea abordări sunt mult mai laborioase și mai costisitoare și nu pot fi utilizate în investigațiile de teren, astfel că metoda propusă de noi, prin colorare cu carmin acetic este net superioară altor abordări.

Procedeul propus este ușor de însușit și poate să fie generalizat la nivel național. Se oferă astfel un instrument științific bazat pe rigoare în rezolvarea impactului de mediu în condițiile actuale ale globalizării și expansiunii industriale și asociat acestora ale deteriorării și poluării mediului ambiant.

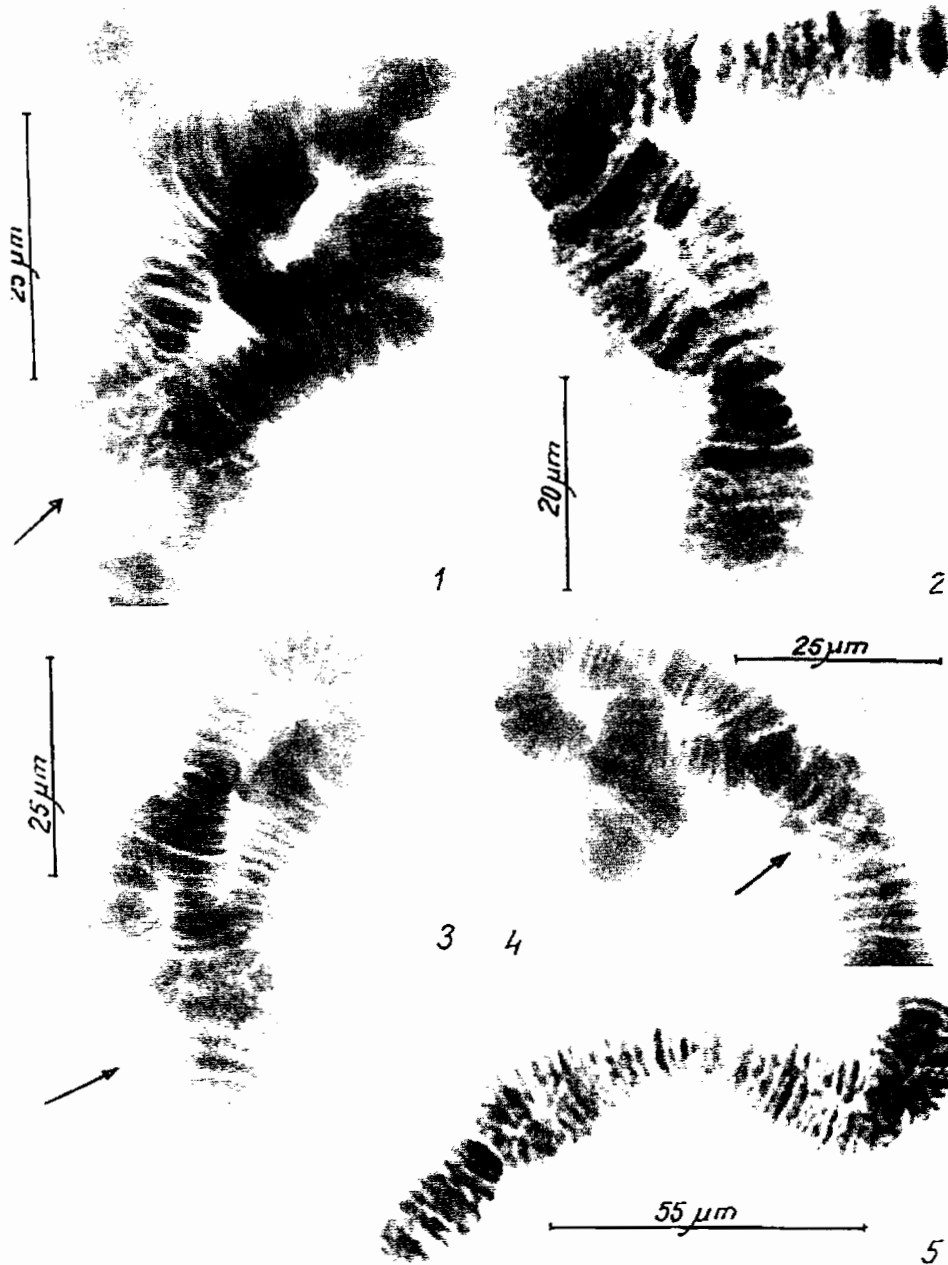


Fig. 1 Rearanjament cromozomal complex (inversie + translocație) într-un cromozom politen de *Chironomus plumosus*, vizualizat cu obiectivul de imersie și fotografiat la diferite niveluri focale (1, 3, 4). Inversii paracentrice subterminale și intercalare în cromozomi politeni de *Chironomus plumosus* vizualizate cu obiectivul imersie (2, 5). Săgețile indică inele Balbiani (original Gavrilă, 1983).

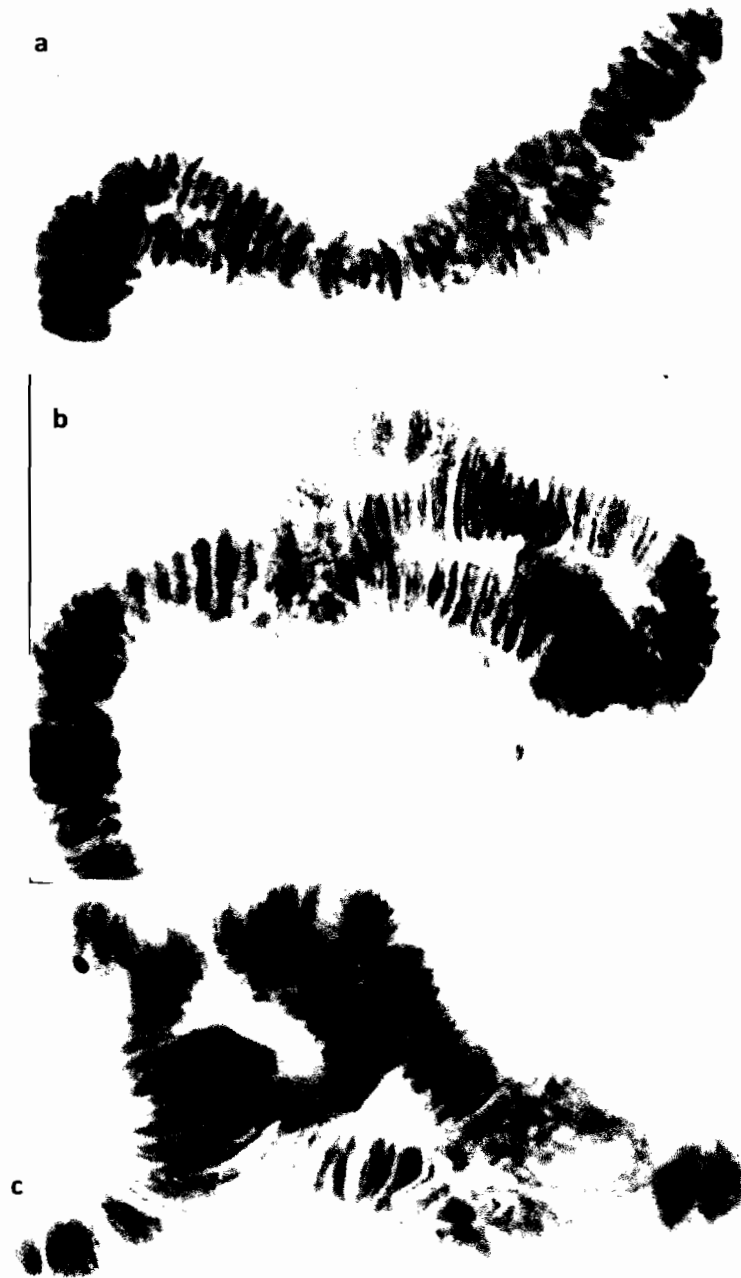
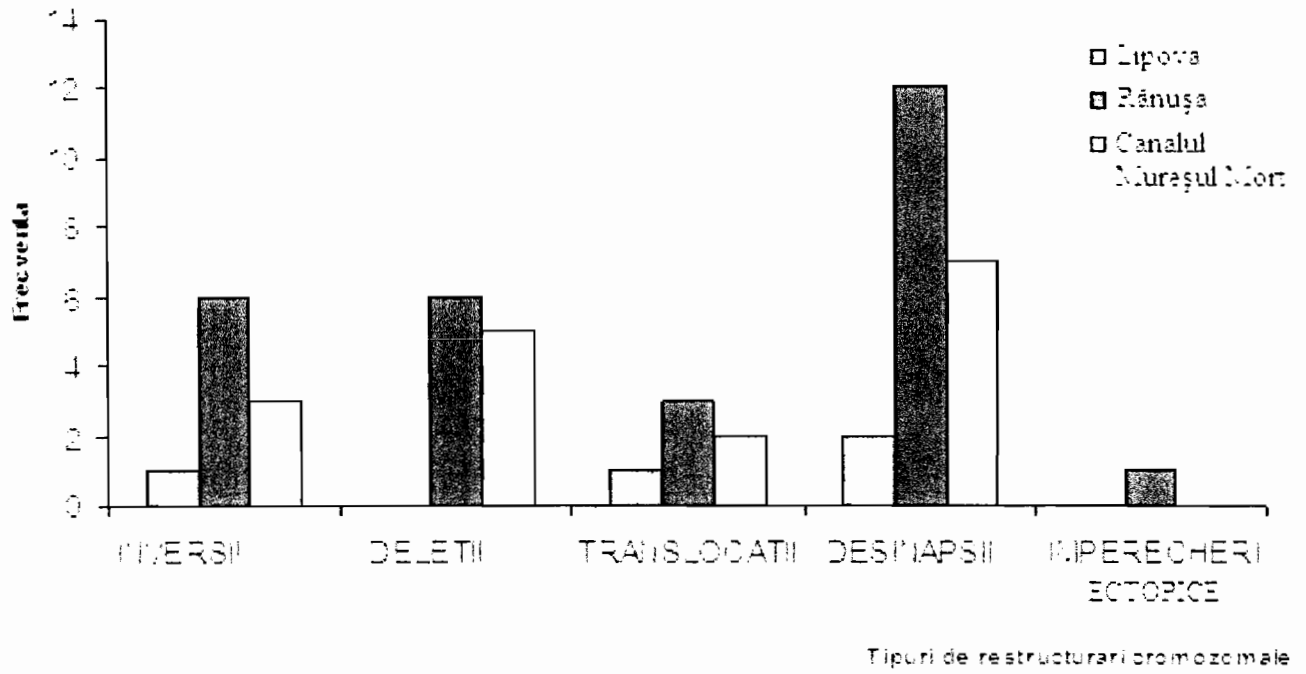


Fig. 2 Unele rearanjamente cromozomale: bucle de inversie intercalară (a) rearanjament cromozomal complex (interschimb complex (b și c) la *Chironomus plumosus* (original Gavrilă, 2003).

Tabel 1 Frecvența aberațiilor cromozomale somatice la specia *Chironomus plumosus* din zonele poluate și din zona de control.

ZONA	Nr. indivizi analizați	Nr. nuclei politeni analizați	Spectrul rearanjamentelor cromozomale (nr. indivizi/100 nuclei politeni)				
			INVERSII	DELEȚII	TRANSLOCAȚII	DESINAPSII	ÎMPERECHERI ECTOPICE
CONTROL (NEPOLUATĂ) LIPOVA	35	100	1	0	1	2	0
POLUATĂ 1 (RADIOACTIV) RĂNUȘA	35	100	6	6	3	12	1
POLUATA 2 (METALE GRELE) MURESUL MORT ARAD	35	100	3	5	2	7	0
Zona			Chi-patrat a lui Yates'		Valoarea p a lui Yates'		Gradul de libertate
Poluată 1 vs Control			1.605		0.8078932		4
Poluată 2 vs Control			0.421		0.93587103		3
Poluată 1 vs Poluată 2			0.266		0.99190195		4
Poluată 1 vs Poluată 2 vs Control			2.797		0.94644377		8

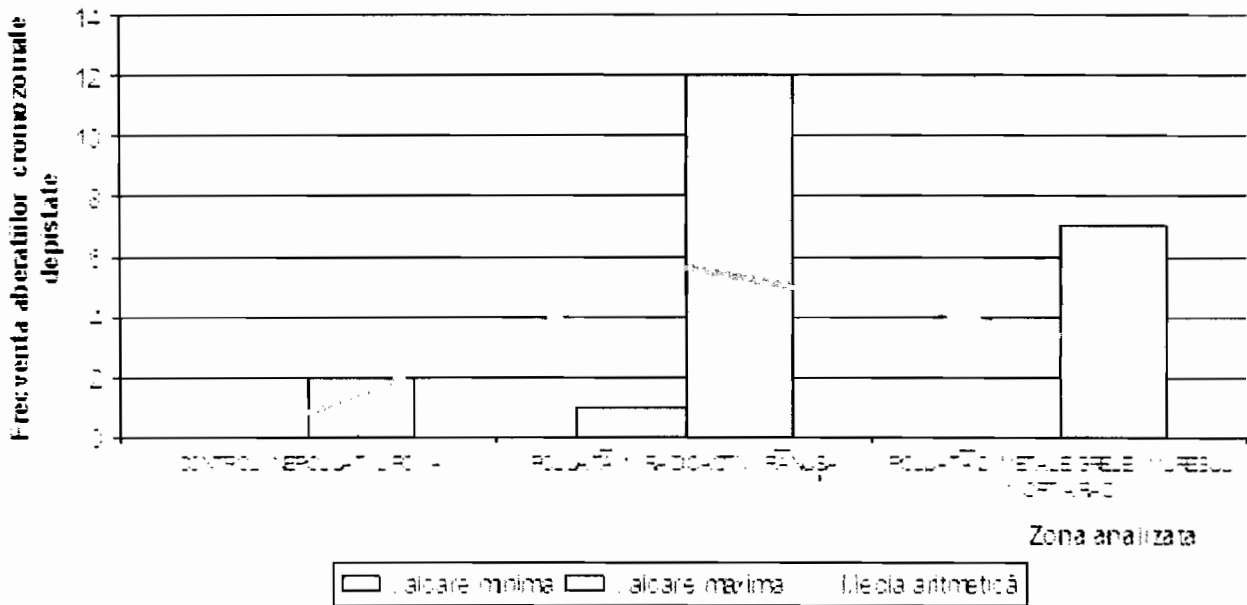
Grafic 1 Histograma incidenței rearanjamentelor cromozomale la *Chironomus plumosus*, în zonele investigate Lipova (control), Rănușa și Canalul Mureșul Mort Arad (zone poluate).



Tabel 2 Valorile unor indicatori statistici pentru restructurările cromozomale întâlnite la *Chironomus plumosus*, din zonele analizate.

Indicator statistic	CONTROL (NEPOLUAT) LIPOVA	ZONA POLUATĂ 1 (RADIOACTIV) RĂNUȘA	ZONA POLUATĂ 2 (METALE GRELE) MUREȘUL MORT ARAD
Media aritmetică	0.8	5.6	3.4
Er. standard a mediei	0.374165739	1.860107524	1.208304597
Abaterea standard	0.836660027	4.159326869	2.701851217
Coeficientul de variație	1.045825033	0.742736941	0.794662123
Valoarea minimă	0	1	0
Valoarea maximă	2	12	7
Nr. valorilor caract.	5	5	5
Asimetria	0.343621597	0.572407708	0.122440323
Abaterea medie	0.8	3.6	2.6
Mediana	1	6	3
Amplitudinea de var.	2	11	7
Nivelul de conf. (0,95)	1.038850665	5.164486408	3.354791403
Limita inf. de conf.	0.425834261	3.739892476	2.191695403
Limita sup. de conf.	1.174165739	7.460107524	4.608304597

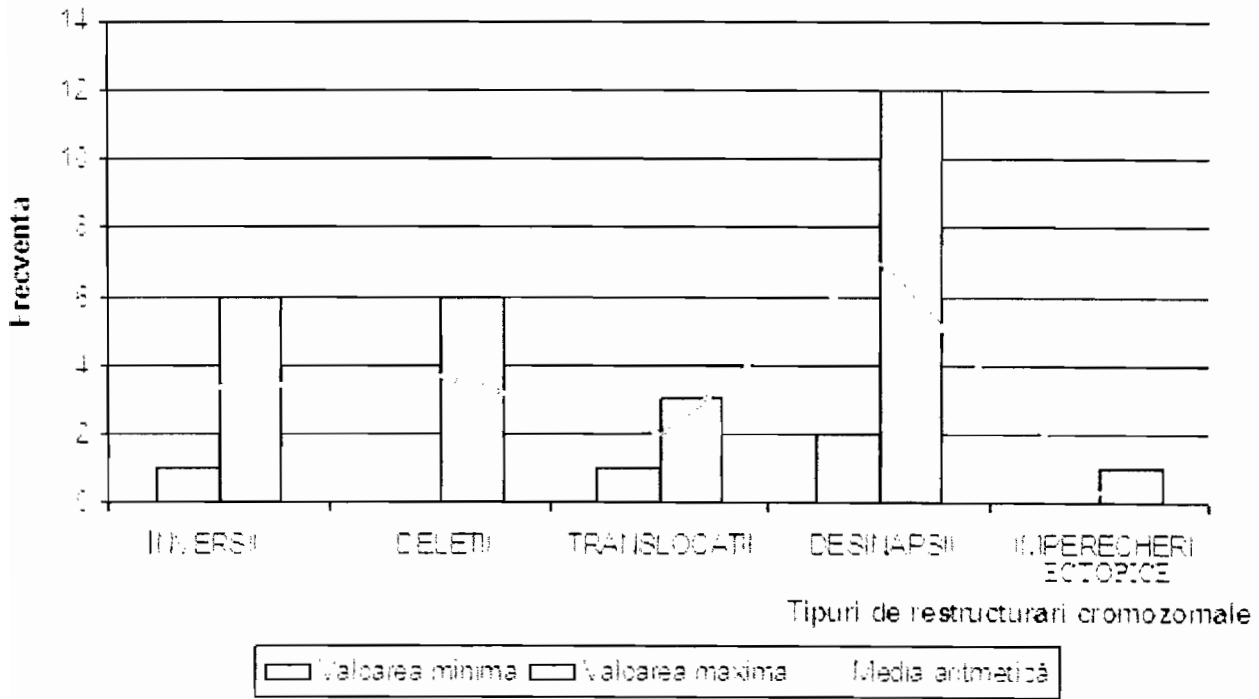
Grafic 2 Curba de variație a incidenței restructurării cromozomale depistate la *Chironomus plumosus*, în zonele analizate.



Tabel 3 Valorile unor indicatori statistici referitoare la restructurările cromozomale depistate la *Chironomus plumosus*, din materialul analizat din cele trei zone investigate.

Indicator statistic	INVERSII	DELEȚII	TRANSLOCAȚII	DESINAPSII	ÎMPERECHERI ECTOPICE
Media aritmetică	3.333333333	3.666666667	2	7	0.333333333
Er. standard a mediei	1.452966315	1.855921454	0.577350269	2.886751346	0.333333333
Abaterea standard	2.516611478	3.214550254	1	5	0.577350269
Coeficientul de variație	0.754983444	0.876695524	0.5	0.714285714	1.732050808
Valoarea minimă	1	0	1	2	0
Valoarea maximă	6	6	3	12	1
Nr. valorilor caract.	3	3	3	3	3
Asimetria	0.239063147	-0.630903857	0	0	0.707106781
Abaterea medie	2.666666667	3.666666667	1	5	0.666666667
Mediana	3	5	2	7	0
Amplitudinea de var.	5	6	2	10	1
Nivelul de conf. (0,95)	6.251609802	7.985385895	2.484137774	12.42068863	1.434217572
Limita inf. de conf.	1.880367019	1.810745212	1.422649731	4.113248654	-5.55E-17
Limita sup. de conf.	4.786299648	5.522588121	2.577350269	9.886751346	0.666666667

Grafic 3 Curba de variație a incidenței restructurărilor cromozomale depistate la *Chironomus plumosus*, din materialul analizat din cele trei zone investigate.



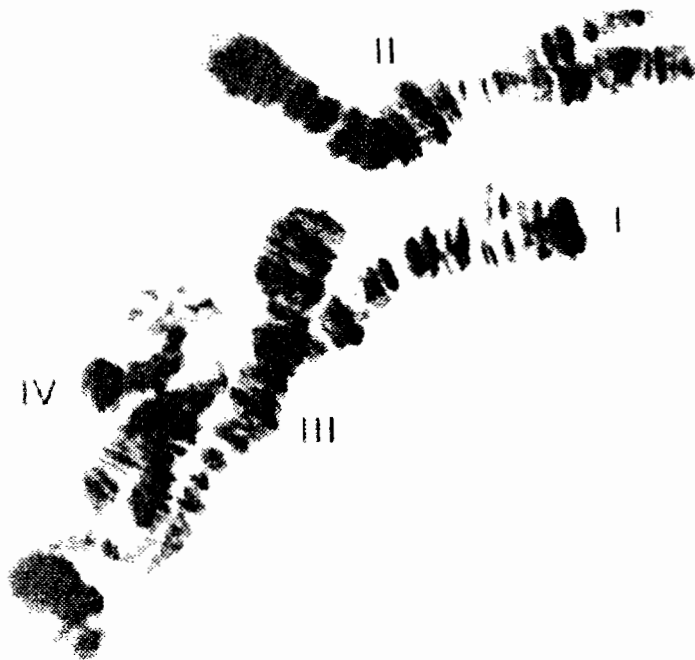


Fig. 3 Monosomia cromozomului politen IV de *Chironomus plumosus* și efectele genomice ale „zgomotului citogenetic” determinat de aceasta și exprimat prin remanieri cromozomale ce afectează ceilalți cromozomi ai complementului.

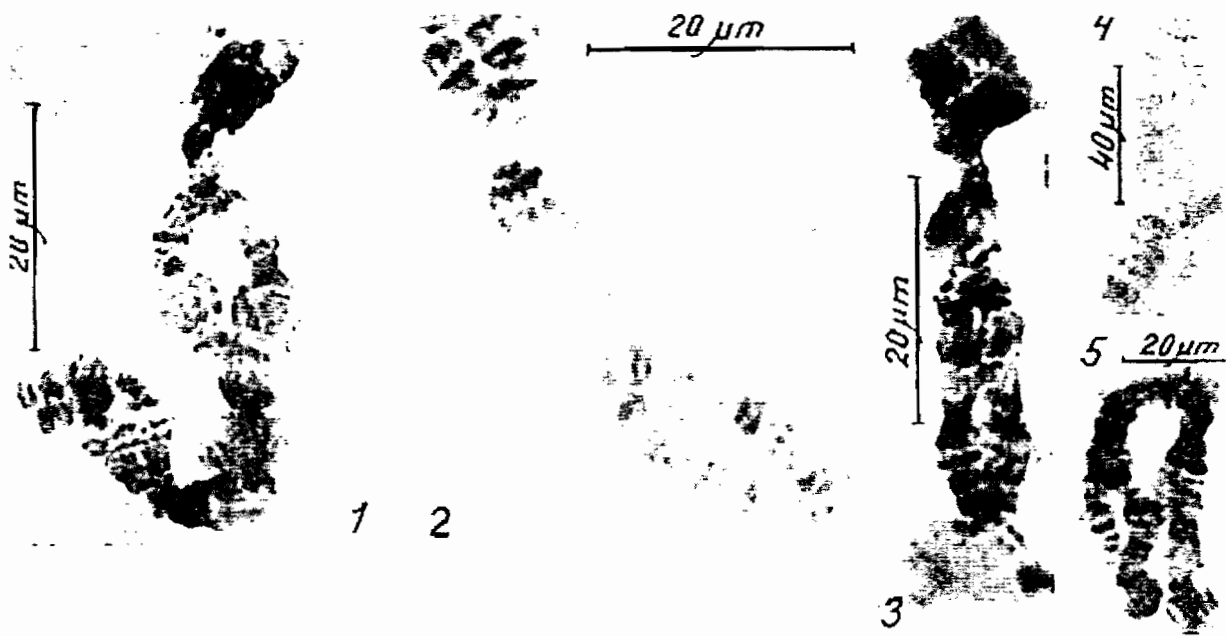


Fig. 4 Inele Balbiani în cromozomii politeni de *Rhagoletis* (1, 3, 4). Inversie în cromozomii politeni de *Rhagoletis*. Rearanjament cromozomal complex reprezentat de o inversie asociată cu o împerechere ectopică (5). La *Rhagoletis*, unii cromozomi politeni sunt asociați cu un corpuscul terminal sferic sau elipsoidal de tip nucleolar. Formarea acestor corpusculi de tip nucleolar este o caracteristică generală a locilor activi. Ei pot reprezenta nucleoli secundari. În anumite cazuri, aceștia prezintă o structură complexă asemănătoare unei rețele de fibrile sau un strat dublu având o zonă centrală densă și un strat periferic mai puțin dens (3). Poziția lor este, de obicei, terminală (original Gavrilă, 1983).

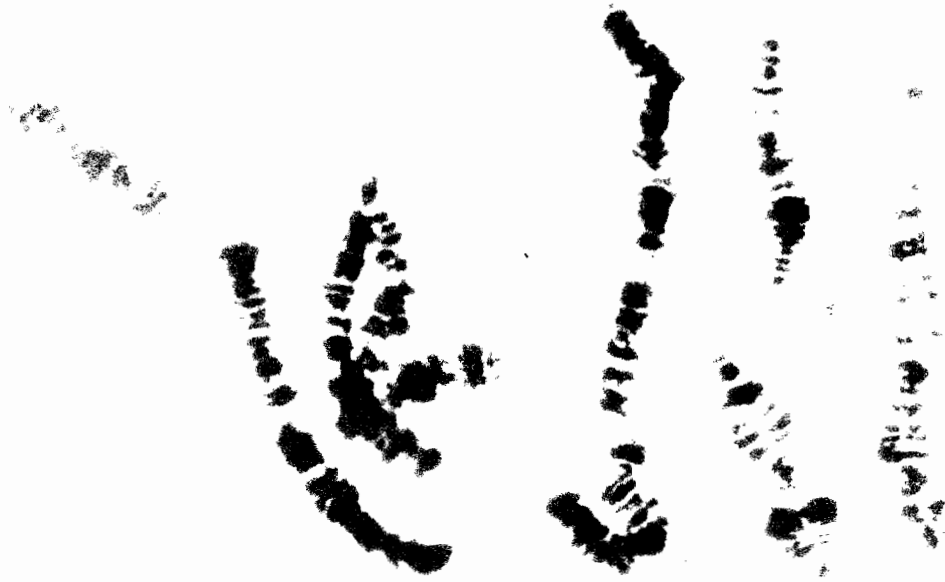


Fig. 5 Numeroase și complexe restructurări cromozomale în cromozomii politeni de la *Rhagoletis cerasi*. Pot fi remarcate sectoare subreplicate ale acestor cromozomi ce apar ca fibre de cromatină de aproximativ 30 μ m diametru, contrastând cu sectoarele supuse numeroaselor runde de replicare care adoptă fenotipul cromozomal politen (original, Gavrilă).



Fig. 6 Bucle de inversie în brațul unui cromozom politen la *Rhagoletis cerasi* (original, Gavrilă).

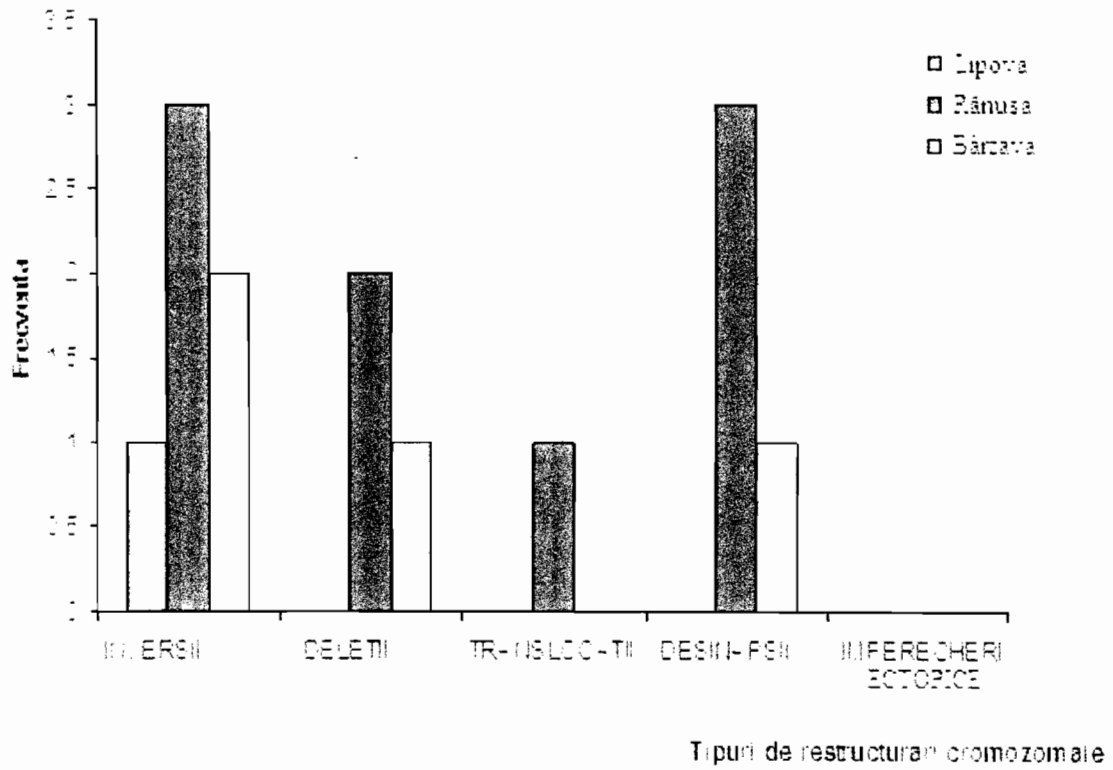


Fig. 7 Inel de inversie în brațul unui cromozom politen de *Rhagoletis cerasi* (original, Gavrilă).

Tabel 4 Frecvența aberațiilor structurale la *Rhagoletis cerasi*, din zonele poluate și zona de control.

ZONA	Nr. indivizi analizati	Nr. nucleii politeni analizati	Spectrul rearanjamentelor cromozomale (nr. indivizi/100 nucleii politeni)				
			INVERSII	DELEȚII	TRANSLOCAȚII	DESINAPSII	ÎMPERECHERI ECTOPICE
CONTROL (NEPOLUATĂ) LIPOVA	35	100	1	0	0	0	0
POLUATĂ 1 (RADIOACTIV) RĂNUȘA	35	100	3	2	1	3	0
POLUATĂ 2 (RADIOACTIV, PULBERI DE PRAF) BÎRZAVA	35	100	2	1	0	1	0
Zona			Chi-patrat a lui Yates'	Valoarea p a lui Yates'	Gradul de libertate		
Poluată 1 vs Control			2.454	0.4836617	3		
Poluată 2 vs Control			1.146	0.5638314	2		
Poluată 1 vs Poluată 2			0.54	0.91001969	3		
Poluată 1 vs Poluată 2 vs Control			3.735	0.71248606	6		

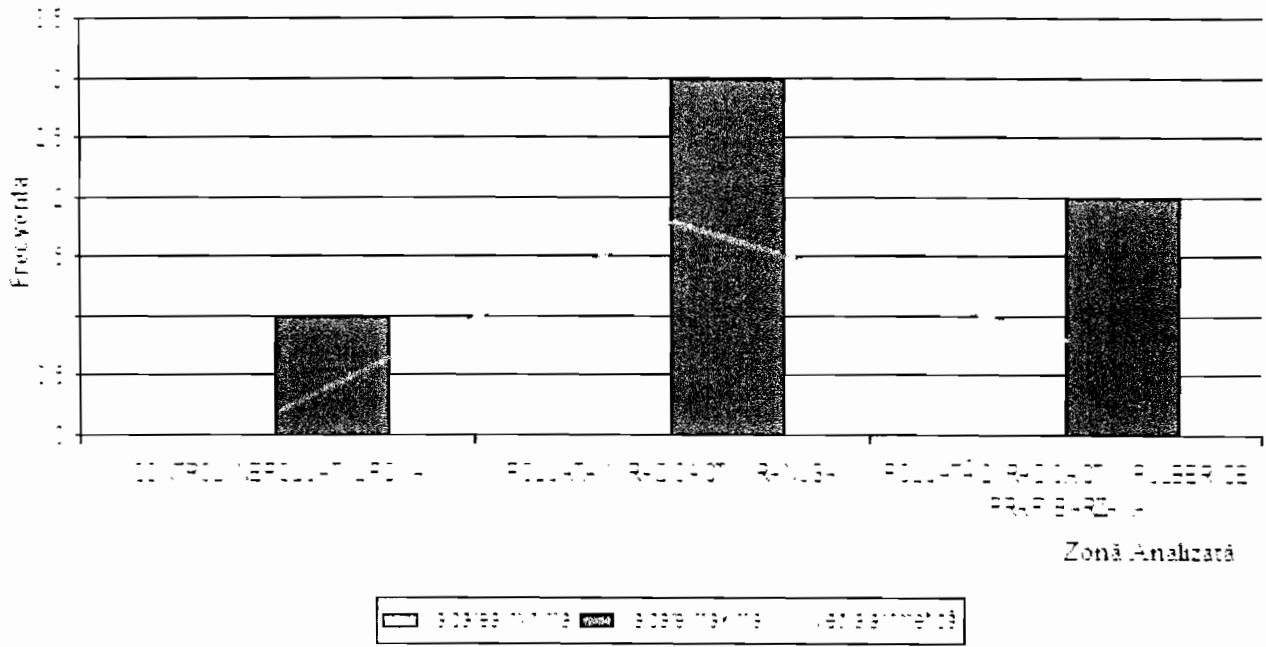
Grafic 4 Histograma incidenței rearanjamentelor cromozomale la *Rhagoletis cerasi*, în zonele investigate Lipova, Rănușa și Bîrzava.



Tabel 5 Valorile unor indicatori statistici pentru restructurările cromozomale întâlnite la *Rhagoletis cerasi*, din zonele analizate.

Indicator statistic	CONTROL (NEPOLUAT) LIPOVA	ZONA POLUATĂ 1 (RADIOACTIV) RĂNUȘA	ZONA POLUATĂ 2 (RADIOACTIV, PULBERI DE PRAF) BÎRZAVA
Media aritmetică	0.2	1.8	0.8
Er. standard a mediei	0.2	0.5830952	0.374165739
Abaterea standard	0.447214	1.3038405	0.836660027
Coeficientul de variație	2.236068	0.7243558	1.045825033
Valoarea minimă	0	0	0
Valoarea maximă	1	3	2
Nr. valorilor caract.	5	5	5
Asimetria	1.5	-0.363173	0.343621597
Abaterea medie	0.4	1.3	0.8
Mediana	0	2	1
Amplitudinea de var.	1	3	2
Nivelul de conf. (0,95)	0.555289	1.6189318	1.038850665
Limita inf. de conf.	1.11E-16	1.2169048	0.425834261
Limita sup. de conf.	0.4	2.3830952	1.174165739

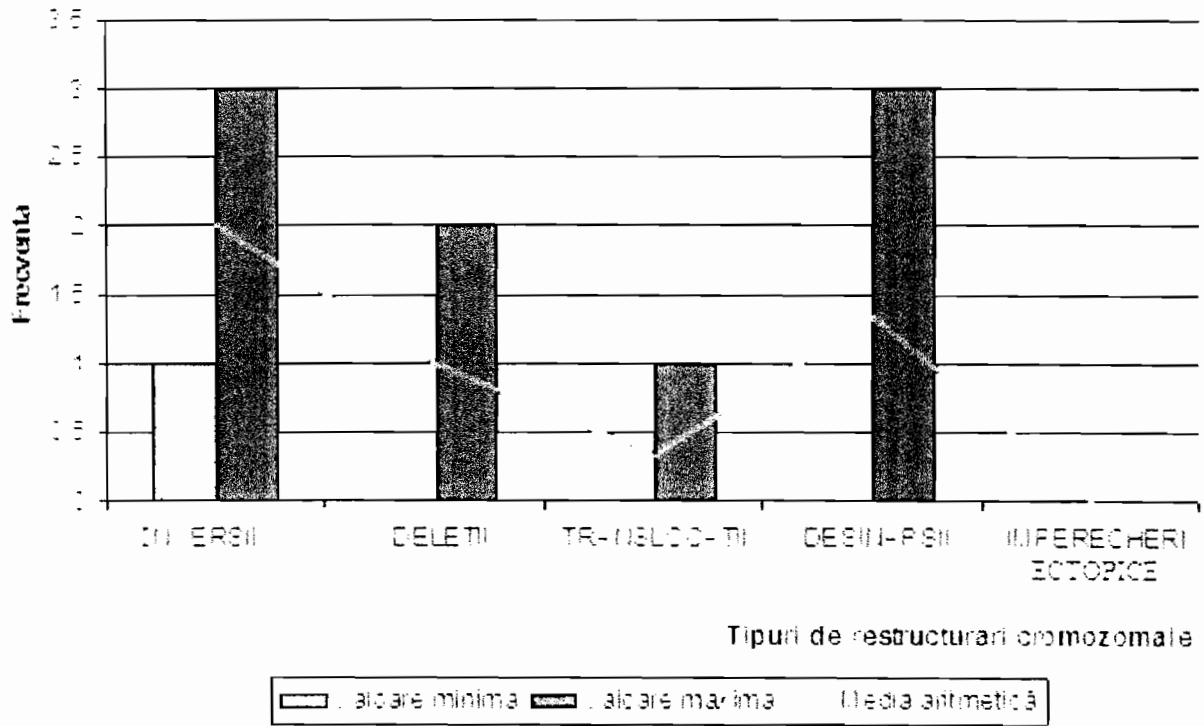
Grafic 5 Curba de variație a incidenței restructurărilor cromozomale depistate la *Rhagoletis cerasi*, din zonele analizate.



Tabel 6 Valorile unor indicatori statistici privind restructurările cromozomale depistate la *Rhagoletis cerasi*, din materialul analizat în cele trei zone investigate.

Indicator statistic	INVERSII	DELEȚII	TRANSLOCAȚII	DESINAPSII	ÎMPERECHERI ECTOPICE
Media aritmetică	2	1	0.333333333	1.333333333	0
Er. standard a mediei	0.57735	0.5773503	0.333333333	0.881917104	0
Abaterea standard	1	1	0.577350269	1.527525232	0
Coeficientul de variație	0.5	1	1.732050808	1.145643924	0
Valoarea minimă	1	0	0	0	0
Valoarea maximă	3	2	1	3	0
r. valorilor caract.	3	3	3	3	0
Asimetria	0	0	0.707106781	0.381801774	0
Abaterea medie	1	1	0.666666667	1.666666667	0
Mediana	2	1	0	1	0
Amplitudinea de var.	2	2	1	3	0
Nivelul de conf. (0,95)	2.484138	2.4841378	1.434217572	3.794583082	0
Limita inf. de conf.	1.42265	0.4226497	-5.55E-17	0.45141623	0
Limita sup. de conf.	2.57735	1.5773503	0.666666667	2.215250437	0

Grafic 6 Curba de variație a incidenței restructurărilor cromozomale depistate la *Rhagoletis cerasi*, din materialul analizat în cele trei zone investigate.



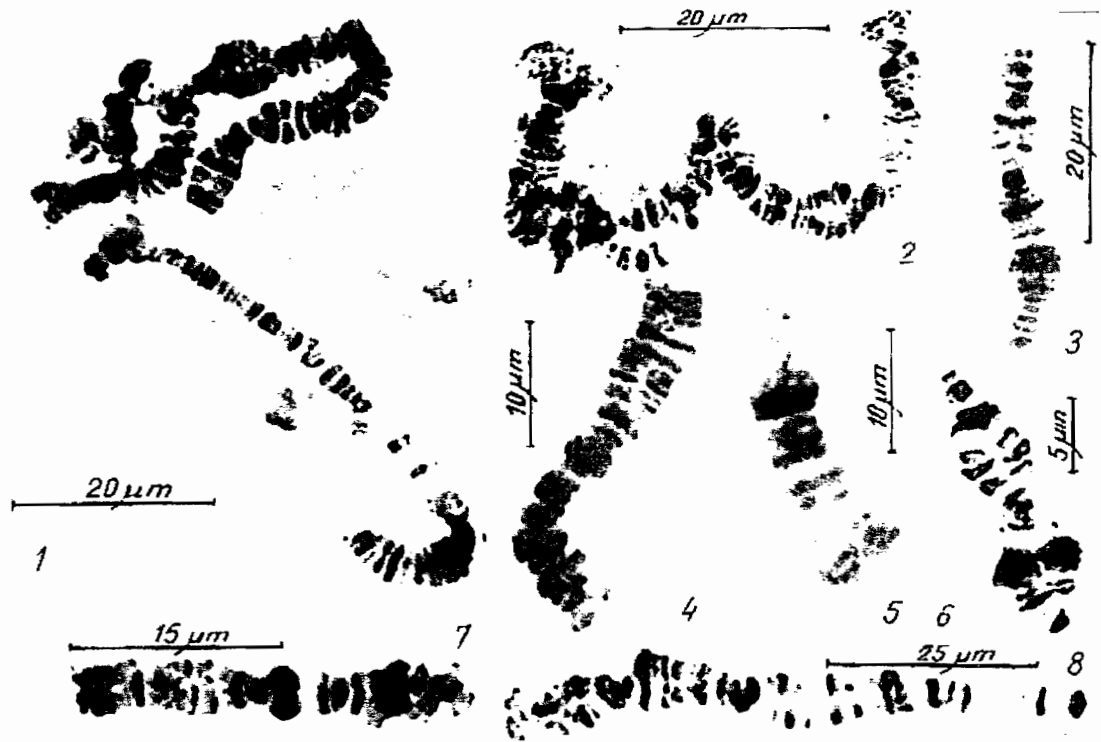


Fig. 8 Inversii subterminale în cromozomii politeni de *Mycetophila* (1-4, 6-8). Inversie terminală în cromozomii politeni de *Mycetophila* (5) (după Gavrilă, 1983).



Fig. 9 Complement cromozomal politen de *Mycetophila agarici* cu multiple restructurări cromozomale (original, Gavrilă).

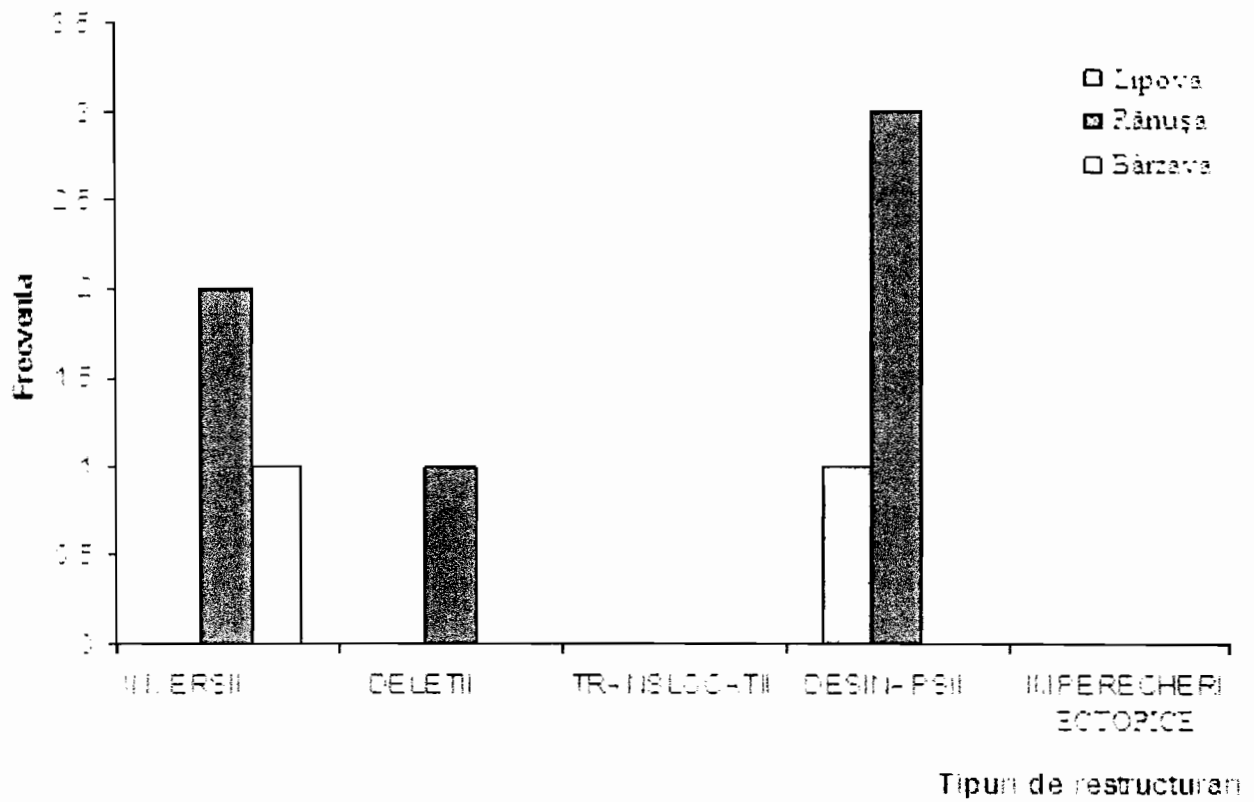


Fig. 10 Inel de inversie terminală într-un cromozom politen de *Mycetophila agarici* (original, Gavrilă).

Tabel 7 Frecvența aberațiilor cromozomale structurale, la *Mycetophila agarici*, din zonele poluate și zona de control.

ZONA	Nr. indivizi analizați	Nr. nuclei politeni analizați	Spectrul rearanjamentelor cromozomale (nr indivizi/100 nuclei politeni)				
			INVERSII	DELEȚII	TRANSLOCAȚII	DESINAPSII	ÎMPERECHERI ECTOPICE
CONTROL (NEPOLUATĂ) LIPOVA	35	100	0	0	0	1	0
POLUATĂ 1 (RADIOACTIV) RANUSA	35	100	2	1	0	3	0
POLUATA 2 (RADIOACTIV, PULBERI DE PRAF) BÎRZAVA	35	100	1	0	0	0	0
Zona			Chi-patrat a lui Yates'	Valoarea p a lui Yates'	Gradul de libertate		
Poluată 1 vs Control			1.24	0.53794444	2		
Poluată 2 vs Control			0	1	1		
Poluată 1 vs Poluată 2			1.069	0.5859622	2		
Poluată 1 vs Poluată 2 vs Control			2.528	0.63962908	4		

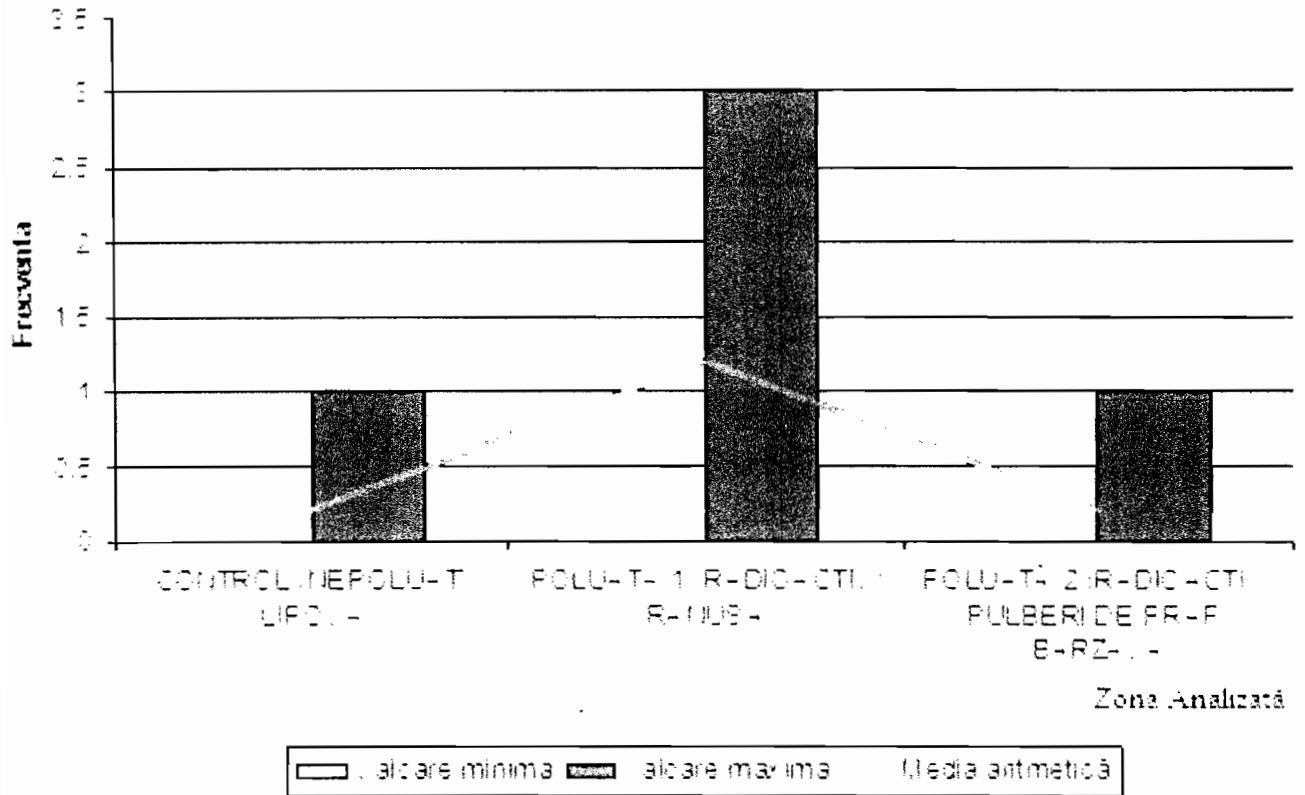
Grafic 7 Histograma incidenței rearanjamentelor cromozomale la *Mycetophila agarici*, în zonele investigate Lipova, Rănușa și Bîrzava.



Tabel 8 Valorile unor indicatori statistici pentru restructurările cromozomale întâlnite la *Mycetophila agarici*, din zonele analizate.

Indicator statistic	CONTROL. (NEPOLUAT) LIPOVA	ZONA POLUATĂ 1 (RADIOACTIV) RĂNUȘA	ZONA POLUATĂ 2 (RADIOACTIV, PULBERI DE PRAF) BÎRZAVA
Media aritmetică	0.2	1.2	0.2
Er. standard a mediei	0.2	0.583095	0.2
Abaterea standard	0.447214	1.30384	0.447214
Coeficientul de variație	2.236068	1.086534	2.236068
Valoarea minimă	0	0	0
Valoarea maximă	1	3	1
Nr. valorilor caract.	5	5	5
Asimetria	1.5	0.363173	1.5
Abaterea medie	0.4	1.3	0.4
Mediana	0	1	0
Amplitudinea de var.	1	3	1
Nivelul de conf. (0,95)	0.555289	1.618932	0.555289
Limita inf. de conf.	2.78E-17	0.616905	1.11E-16
Limita sup. de conf.	0.4	1.783095	0.4

Grafic 8 Curba de variație a incidenței restructurărilor cromozomale depistate la *Mycetophila agarici*, din zonele analizate.



Tabel 9 Valorile unor indicatori statistici referitoare la restructurările cromozomale depistate la *Mycetophila agarici*, din materialul analizat în cele trei zone investigate.

Indicator statistic	INVERSII	DELEȚII	TRANSLOCAȚII	DESINAPSII	ÎMPERECHERI ECTOPICE
Media aritmetică	1	0	0	0.333333	0
Er. standard a mediei	0.57735	0	0	0.333333	0
Abaterea standard	1	0	0	0.57735	0
Coeficientul de variație	1	0	0	1.732051	0
Valoarea minimă	0	0	0	0	0
Valoarea maximă	2	0	0	1	0
Nr. valorilor caract.	3	0	0	3	0
Asimetria	0	0	0	0.707107	0
Abaterea medie	1	0	0	0.666667	0
Mediana	1	0	0	0	0
Amplitudinea de var.	2	0	0	1	0
Nivelul de conf. (0,95)	2.484138	0	0	1.434218	0
Limita inf. de conf.	0.42265	0	0	-5.55E-17	0
Limita sup. de conf.	1.57735	0	0	0.666667	0

Grafic 9 Curba de variație a incidenței restructurărilor cromozomale depistate la *Mycetophila agarici*, din materialul analizat din cele trei zone investigate.

