Section A: *Genetic and physiological aspects of control and improvement of adaptive and productive potential in crop plants*

UDC: 575:631.526 https://doi.org/10.53040/gppb8.2024.01

ABORDĂRI METODOLOGICE DE SPORIRE A DIVERSITĂȚII ÎN SOLUȚIONAREA SUBIECTELOR DIN GENETICA ȘI AMELIORAREA PLANTELOR

Andronic Larisa
Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, USM, Chișinău, Republica Modova
https://orcid.org/0000-0002-2761-9917, e-mail: larisa.andronic@sti.usm.md

METHODOLOGICAL APPROACHES TO INCREASE DIVERSITY IN DEVELOPING OF TOPICS IN GENETICS AND PLANT BREEDING

Summary. The classical methodological approaches proposed for solving the objectives of the sub-program „*Genetic and biotechnological approaches to the agroecosystems management under climate change*" are argued through the prism of the modern methods of inducing genetic variability. To study the functionality of species/genotypes in dependence of environmental conditions it is proposed multivalent genetic, biotechnological, physiological techniques, aimed to develop measures to ensure the sustainability of agrosystems in the conditions of unfavorable environmental factors fluctuation (water restrictions, high temperatures) of crops genotypes with economic interest (winter barley, common wheat, corn, sunflower, tomato, as well as perennials, such as plum and apple). In this order is proposed the methods of inducing genetic variability through physical mutagenesis (ionizing radiation), cellular biotechnologies (gametic selection, *in vitro* culture of embryos, anthers). The proposed strategies will allow to obtaining and selecting genotypes of autumn barley, common wheat, corn, sunflower with ecological plasticity to ensure the sustainability of agrosystems.

Keywords: crop germplasm, genetic variation, crossing, mutagenesis, transgenesis.

Schimbările climatice afectează toate domeniile de dezvoltare ale unui stat; majoritatea sectoarelor fiind vulnerabile la factorii de mediu și afectate de fenomenele extreme. Creșterea continuă a populației umane, care conform prognozelor va ajunge la 10 miliarde până în 2050, condiționează provocări enorme prin necesitatea de a satisface cererea de alimente. Pentru a asigura solicitările crescânde față de producția agricolă este necesară o majorare de până la 60% a randamentului culturilor agricole [19]. În condițiile schimbărilor climatice culturile agricole sunt supuse unii presing sever abiotic, ce influențează recolta și calitatea acesteia, care modifică substanțial și reacția la factorii biotici [5]. Temperaturile ridicate, perioadele mai lungi de secetă și căldură, riscurile crescute de îngheț târziu, fenomenele de precipitații abundente și fenomenele meteorologice extreme pun în pericol sistemele de producție agricolă. În același timp, intensificarea sistemelor agricole și utilizarea excesivă a terenurilor au efecte negative asupra mediului, precum fragmentarea/pierderea habitatului și pierderea biodiversității, degradarea resurselor de apă și sănătății solului. Evenimentele climatice nefavorabile subliniază fragilitatea agrosistemelor și accentuează importanța reducerii efectelor negative a consecințele schimbărilor climatice asupra culturilor, evidențiind necesitatea sporirii diversității și adaptabilității.

Schimbările climatice și pierderea habitatului reprezintă amenințări serioase la adresa naturii prin influențe antropice și conversia terenurilor, tehnologiile ce au dus la omogenizarea biotică și reducerea biodiversității [15]. Schimbarea biodiversității în perioadele recente sunt o reflecție a

interacțiunilor climă-ecosisteme produse asupra speciilor și taxonilor cu un diferit impact asupra sistemelor naturale, seminaturale sau cultivate. Agrosistemele spre deosebire de cele naturale sunt supuse nu doar presiunilor cauzate de factorii de mediu și biotici, poluare, dar se află permanent sub amenințările provocate de sistemele de agricultură intensivă, interesul comercial, monocultură, introducerea de soiuri neadaptate la condițiile locale. Conexiunile specifice stabilite în cadrul sistemelor în relație cu factorii externi sunt extrem de complexe, indicând necesitatea aprecieri funcţionalității pentru fiecare specie/genotip și condiții ambientale. Culturile agricole se caracterizează printr-o sursa limitată de variații genetice utile a trăsăturile agrobiologice, ca urmare a procesului de ameliorare realizat direcționat pentru anumite caractere de interes. Pentru extinderea genofondului speciilor cultivate, sunt necesare abordări inovaționale pentru lărgirea spectrului de variații genetice, care constituie baza genetică a ameliorării.

De-a lungul istoriei ameliorării plantelor pentru crearea de noi genotipuri au fost utilizate tehnicile precum încrucișarea, mutageneza și reproducerea transgenică. Ameliorarea tradițională a plantelor prin încrucișarea plantelor implică combinarea țintită a genitorilor cu trăsături cunoscute/prestabilite. Procesul de încrucișare utilizează variabilitatea bazată pe recombinarea meiotică, segregarea aleatorie a alelelor în anafaza meiozei, contopirea incidentală a gameților, evenimente ce prezintă o sursă importantă de obținere de forme cu caractere noi. Această strategie a fost aplicată în crearea unui număr semnificativ de hibrizi/soiuri, a constituit elementul principal al Revoluției verzi [9]. Eforturile de încrucișare au oferit o diversitate remarcabilă pentru diferitele specii și chiar au condus la crearea unor culturi noi, cum ar fi triticale. Cu toate acestea, încrucișarea poate fi folosită doar pentru a introduce însușiri care sunt deja prezente în genomul parental, necesită o perioadă lungă de selecție individuală, ceea ce limitează utilizarea acestei tehnici.

Mutageneza indusă chimic sau prin radiații este utilizată pentru a cauza modificări aleatorii la nivelul întregului genom, ceea ce extinde mult variația genetică (Holme et al., 2019 citat după [9]) și constituie o metodă eficientă pentru schimbarea materialului genomic prin majorarea frecvenței diferitor tipuri de mutații, crescând artificial diversitatea genetică a trăsăturilor morfofiziologice. Conform datelor FAO/IAEA [11], aplicarea mutagenezei fizice este un procedeu important în programele de ameliorare a plantelor, numărul de varietăți mutante constituind 3275 pentru cca 220 specii, prezentând în continuare o creștere semnificativă după anii 2000, când erau înregistrate 2252. Spre deosebire de încrucișare, mutageneza nu numai că scurtează timpul de reproducere, iar față de reproducerea transgenică, are și avantajul de a fi considerată non-modificare genetică [6]. Astfel, produsele generate prin această abordare pot obține mai ușor aprobarea de reglementările guvernamentale. Printre acestea pot fi menționate produsele din seriile Clearfield® și Provisia™ [5], care oferă o gamă de genotipuri dezvoltate prin mutageneză la porumb, grâu, orez, rapiță și floarea-soarelui, caracterizate prin rezistență la erbicide și care sunt culturi non-transgenice. Seria Clearfield este una dintre puținele sisteme tolerante la erbicide. De asemenea, seria Provisia™, elaborată la orezul nemodificat genetic, deține rezistență la erbicide prin inhibarea acetil-coenzimei A carboxilaza (ACCaza), și are o largă promovare comercială la nivel global [4]. Este important de menționat, că prima cultură cu rezistență la erbicide care inhibă ACCaza, și anume soiul de porumb Black Mexican Sweet cu toleranță la setoxidimă (exercită activitate erbicidă asupra majorității monocotiledonatelor), a fost obținută prin cultura de calus [16], o metodă dovedită eficientă în inducerea variabilității genetice. În pofida eficacității metodei și interesului față de soiurile mutante, aplicabilitatea mutagenezei rămâne limitată din cauza frecvenței scăzute de mutații de interes și a caracterului aliator al mutațiilor induse, reducând semnificativ posibilitatea utilizării procedeului în scopul dobândirii simultane a mai multor însușiri valoroase.

Un alt instrument de extindere a variabilității genetice, bazat pe variabilitatea somaclonală, indusă de cultura de celule și țesuturi, oferă o nouă sursă de variație în cadrul unei specii care poate fi utilizată pentru îmbunătățirea culturilor [2; 7; 10]. Selecția de noi variante prin variația somaclonală indusă *in vitro* asigură generarea de genotipuri cu trăsături agronomice importante, care pot fi exploatate în ameliorare. În ultimele 3-4 decenii, au fost selectate mai multe variante

somaclonale cu trăsături agronomice utile, cum ar fi productivitatea, calitatea, rezistența la boli, toleranța la stres abiotic, etc. [10; 17; 18]. Pe baza acumulării studiilor biotehnologice sunt raportate date cu privire la selectarea somaclonelor valoroase la multe specii de plante: hrișcă cu productivitate majoră și conținut înalt de proteină, mărimea boabelor; grâu și sorg cu randament ridicat, conținut crescut de proteine, coacere precoce, rezistență la boli; trestia de zahăr cu conținut înalt de zaharoză și rezistență moderată la putregaiul roșu; variante cu valori majore ale indicilor morfologici la tutun, tomate, cartof, banane, plante ornamentale (crizantema, gălbenele), medicinale și aromatice (ghimbir), etc. Cu toate acestea, puține soiuri au fost derivate din variantele somaclonale din cauza unor limitări, cum ar fi îmbinarea cu trăsăturilor nedorite, instabilitatea genetică [2; 7; 10].

O descoperire cheie în ameliorarea plantelor a fost dezvoltarea plantelor transgenice (plante modificate genetic, PMG), în care genele sau trăsăturile de interes sunt introduse în plantele de cultură, ceea ce duce la obținerea plantelor cu trăsături noi, productivitate înaltă, toleranță îmbunătățită la diferiți factori, inclusiv pesticide. În pofida avantajelor metodologice un număr redus de culturi transgenice au găsit utilizare practică (soia, porumbul, sfeclă de zahăr, rapița, cartoful, bumbacul, papaia, lucerna, mărul, ananasul, dovleacul), deoarece această tehnică integrează aleatoriu ADN-ul străin în genomul plantelor. De asemenea, un impediment important în promovarea practică a organismelor modificate genetic (OMG) sunt reglementările guvernamentale stricte. Unul dintre cultivatorii de bază a PMG este SUA, procentul acestora în 2020 a constituit 94% pentru soia, 96% pentru bumbac și 92% - porumb.

În acest plan, legislația Uniunii Europene privind OMG este rigidă; astfel pentru introducerea în comerț a unei noi culturi modificate genetic se cere obținerea unei autorizații specifice a Comisiei Europene (pe baza unei evaluări a riscurilor de siguranță efectuată de Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară). Până în prezent, Uniunea Europeană a autorizat introducerea în statele membre a unui număr limitat de soiuri de plante modificate genetic. Astfel, pentru cultivare comercială în UE este admis porumbul MON810, care conține o genă a bacteriei *Bacillus thuringiensis* (Bt) ce produce o toxină față de insectele dăunătoare, cum ar fi *Ostrinia nubilalis* (sfredelitorul european al porumbului). În scop de import și utilizare în alimente și furaje au fost autorizate soia, rapița, sfecla de zahăr, bumbacul. Pentru produsele alimentare și furajele care conțin sau sunt produse din OMG este admis pragul de 0,9% de contaminare accidentală sau tehnic inevitabilă.

Republica Moldova este parte semnatară a Protocolului de la Cartagena privind biosecuritatea la Convenția privind diversitatea biologică, care a fost rectificat pe 30.04.2002 și intrat în vigoare la 11.09.2003. Întru respectarea prevederilor protocolului, Republica Moldova a adoptat Legea nr. 152/2022 cu privire la reglementarea și controlul organismelor modificate genetic și Legea nr. 394/2023 privind produsele alimentare și furajele modificate genetic. Astfel, prin adoptarea legilor menționate s-a stabilit domeniul de bază, obligațiile generale și sfera de acțiune ale politicii de stat în domeniul organismelor modificate genetic. Conform Legii nr. 152/2022 cu privire la reglementarea și controlul organismelor modificate genetic este interzisă cultivarea în scopuri comerciale a soiurilor de plante modificate genetic. Ca excepție, este admisă cultivarea plantelor superioare modificate genetic în scop de cercetare științifică realizată în condiții care să excludă diseminarea accidentală.

Cu toate acestea, tendințele din agricultură au indicat că metodele tradiționale nu vor putea ține pasul cu cererile tot mai mari de alimente, fibre și biocombustibil. Biotehnologiile moleculare oferă un instrument important în îmbunătățirea randamentelor culturilor, pot întări eforturile de ameliorare a plantelor pentru a face față acestor noi provocări. Oamenii de știință dezvoltă continuu tehnici mai performante pentru ameliorarea plantelor.

Ingineria țintită a genomului (cunoscută și sub numele de editare a genomului) a apărut ca o alternativă la metodele clasice de ameliorare a plantelor și transgenice pentru a îmbunătăți plantele de cultură. Până de curând, instrumentele disponibile pentru producerea de rupturi ADN dublu catenare specifice erau limitate la nucleazele „degete de zinc” (*Zinc Finger Nucleasee*) și nucleazele

efectoare care activează ca activatori transcripționali (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALEN*). Totodată, aceste tehnologii nu au fost adoptate pe scară largă din cauza design-ului complicat și al asamblării laborioase a proteinelor specifice de legare la ADN-ul pentru fiecare genă țintă.

O tehnică ce oferă aplicabilitate a metodelor de editare a genomului pentru îmbunătățirea culturilor este bazată pe sistemele de editare a genomului mediate de CRISPR/Cas și elementele de reglare a expresiei genelor. Metoda bazată pe sistemul CRISPR/Cas (repetiţii palindromice scurte intercalate în mod regulat, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas (asociat cu CRISPR), permite scindarea țintită a ADN-ului genomic, rezultând modificări ale genelor atât prin mecanisme de unire neomoloagă a capetelor moleculei de ADN, cât și prin mecanisme de reparare omoloagă.

Tehnologiile de editare a genomului CRISPR/Cas permit modificarea țintită a aproape oricărei secvențe pentru a genera noi variații și pentru a accelera eforturile de reproducere. Îmbunătățirea culturilor prin editarea genomului nu este constrânsă de variația existentă limitată sau de cerința de a selecta alele pe parcursul mai multor generații. Aplicarea sistemului CRISPR/Cas la plante este una din tehnicile recente. Primele raportări de utilizare a sistemului Cas9/sgRNA în ingineria genomului plantelor au fost publicate în 2013 în revista *Nature Biotechnology* (citat după [5]), urmate de alte prime lucrări axate în principal pe testarea tehnologiei CRISPR/Cas, folosind metode de expresie tranzitorie, cum ar fi transformarea protoplastelor și expresia în plantă, folosind *Agrobacterium tumefaciens*. În ultimii ani sunt raportate mai multe rezultate de succes de modificare a plantelor bazată pe sistemul CRISPR/Cas9 pentru a accelera îmbunătățirea culturilor și a obține trăsături agronomice dorite, cum ar fi calitatea, toleranța la stres și rezistență la erbicide, datorită eficienței și specificității ridicate a metodei [1; 3; 5; 9; 22]. Conform unui studiu bibliografic [22] se constată un număr impresionant de rezultate ale editării genelor, astfel fiind identificate 28 de specii de plante cultivate (căutarea a fost efectuată pentru 56 specii). Rezultatele de bază se referă prioritar la editarea genelor țintă. În total 287 de gene țintă ale plantelor cultivate au fost supuse editării prin îmbunătățirea proprietăților semnificative pentru reproducere pe parcursul perioadei de aplicare a sistemului CRISPR/Cas. Gama de soiuri modificate a fost extinsă semnificativ, în special pentru grâu, orez, soia, tomate, cartofi, rapiță, struguri și porumb. Schimbarea dorită a trăsăturilor a fost obținută cel mai frecvent prin *knock-out* genetic. De asemenea sunt înregistrate substituții de nucleotide în gena țintă. Acest tip de modificare bazat pe substituții de nucleotide este tot mai frecvent utilizat în tehnologiile de editare a genelor plantelor.

În pofida reușitelor obținute, aplicațiile editării genomului plantelor sunt limitate de lipsa descrierii integrale a genomurilor de referință, de cunoștințele incomplete despre potențialele ținte propuse pentru editare [5].

În contextul acestor argumentări, în dezvoltarea substanțială a programelor de ameliorare a mai multor culturi, un rol important rămâne a fi acordat metodelor convenționale bazate pe exploatarea germoplasmei vegetale. Astfel, hibridările intervarietale și interspecifice, asociate cu manipulări genetice și fitopatologice, s-au dovedit eficiente în îmbunătățirea plantelor pentru rezistența la boli (ciuperci și virusuri) și stres abiotic.

Extinderea bazei genetice a agroculturilor prin biotehnologii celulare, metode ale mutagenezei experimentale, geneticii clasice este una din strategiile moderne ale ameliorării în scopul sporirii adaptabilităţii plantelor de cultură la schimbările climatice [8]. Obținerea de varietăți performante necesită crearea rapidă de noi forme cu combinaţii de gene valoroase prin tehnologii bazate pe cunoașterea particularităților de interacțiune a genotipului cu factori exogeni în diferite condiţii ambientale. În conformitate cu conceptul creării genotipurilor de culturi agricole cu reziliență este importantă identificarea genotipurilor cu adaptabilitate la schimbările climatice și rezistență la agenții patogeni cu impact negativ.

Diversitatea genetică a culturilor agricole și securitatea produselor agroalimentare sunt o preocupare majoră pentru ţările europene, fiind reflectată în orientările strategice cheie ale UE [13],

în care se subliniază necesitatea îmbunătățirii capacității adaptive a plantelor de cultură, consolidarea rezistenței și reducerea vulnerabilității la schimbările climatice, sporirea calității produselor agricole. Cadrul global de biodiversitate (Global Biodiversity Framework, GBF), adoptat în 2022 de 196 țări în timpul celei de-a cincisprezecea reuniuni a Convenției ONU (COP 15), denumit „*Planul pentru Biodiversitate*", care a fost dezvoltat la întâlnirile de la Kunming (China) și Montreal (Canada), trasează acțiunile globale pentru natură, bazându-se pe planuri strategice 2030 și 2050 și stabilește căile orientate spre stoparea degradării biodiversității. Conform *Regulamentului privind refacerea naturii* adoptat în februarie 2024 de Parlamentul European se prevede restabilirea a cel puțin 30 % din suprafețele terestre și maritime până în 2030 și 90 % din toate ecosistemele degradate până în 2050 [12].

În ultimul deceniu în domeniul cercetării și dezvoltării politicilor este formulat conceptul privind legătură „*apă-energie-alimente*", pentru depășirea sensibilității și conferirii rezilienței sistemelor, ce includ referințele de securitate ale mediului, cum ar fi „*securitatea mediului*", „*securitatea climatică*" sau „*biodiversitatea*" [20], evidențiind importanța fiecărui element în parte. Noul concept „*apă-energie-alimente*" extinde sfera studiilor de securitate, aspecte care sunt de o mai mare relevanță pentru asigurarea sustenabilității sistemelor. Securitatea alimentară, energetică și de apă reprezintă o preocupare importantă condiționată de limitarea resurselor naturale. Legătura „*apă-energie-alimente*" formează un complex care necesită instrumente robuste de luare a deciziilor pentru a investiga elementele constitutive și interrelațiile pentru asigurarea durabilității. Abordarea practică și integrată pentru gestionarea durabilă și eficientă a resurselor evidențiază interdependențele, beneficiile comune (sinergiile) și constrângerile dintre cele trei sectoare în vederea atenuării compromisurilor, consolidarea sinergiilor, îmbunătățirea securității resurselor și a guvernanței în cele trei sectoare și îmbunătățirea eficienței sistemelor [14].

Pentru o mai bună cunoaștere a factorilor ce conferă reziliență sistemelor, descriere a relațiilor dintre biodiversitate, funcțiile și serviciile ecosistemelor sunt dezvoltate și propuse soluții bazate pe natură, SBN [21]. În acest context, înțelegerea capacităților SBN este abordată prin mai multe provocări:

- identificarea aspectelor biodiversității pentru dezvoltarea și implementarea SBN;
- explorarea resurselor genetice/diversitatea speciilor și varietăților de organisme, promovând sustenabilitatea, adaptarea, conservarea și restaurarea biodiversității;
- identificarea țintelor cuantificabile pentru evaluarea biodiversității, apreciind efectele negative ale schimbărilor climatice și măsurile bazate pe natură de îmbunătățire pe termen lung a situației ecologice;
- monitorizarea pe termen lung a biodiversității și sănătății ecosistemelor după implementarea unor sisteme bazate pe natură.

În scopul elaborării, optimizării procedeelor genetice, biotehnologice de sporire, evaluarea și selectare a genotipurilor de culturi agricole pentru crearea unui sistem agroalimentar rezilient a fost elaborat și se realizează subprogramul 011101 „*Abordări genetice și biotehnologice de management al agroecosistemelor în condițiile schimbărilor climatice*" (2024-2027), finanțat de Ministerul Educației și Cercetării al RM. Prin abordări multivalente genetice, biotehnologice, fiziologice se propune elaborarea măsurilor de asigurare a durabilității agrosistemelor în condițiile de fluctuație a factorilor nefavorabili de mediu (restricții hidrice, temperaturi ridicate) ce determină sporirea vulnerabilității și erodarea genotipurilor culturilor de interes economic (orz de toamnă, grâu comun, porumb, floarea-soarelui, tomate, precum și multianuale, precum prunul și mărul). În vederea obținerii de genotipuri performante sunt aplicate tehnicile de inducere a variabilității genetice prin mutageneză fizică (radiații ionizante), biotehnologii celulare (selecție gametică, cultura *in vitro* a embrionilor, anterelor); elaborate procedee de *screening* a genotipurilor cu indici performanți și calitate a producției agricole prin metode morfofiziologice, citologice (regularitatea proceselor proliferative, localizarea intracelulară a compușilor secundari și deponenților), biochimice (activitatea enzimelor asociate stresului hidric/termic, analiză calitativă şi cantitativă a proteinelor

de rezervă, polimorfismul izoenzimelor, conținutul de pigmenți fotosintetici, substanțe plastice, glucide totale, etc.), moleculare (PCR, TR-PCR).

Interpretarea multidimensională a informației va permite obținerea și selectarea genotipurilor de culturi agricole (orz de toamnă, grâu comun, porumb, floarea-soarelui) cu caractere performante. Procedeele de sporire a biodiversității asistate de *screening*-ul genotipurilor cu însușiri utile vor asigura diminuarea declinului resurselor biologice și valorificarea eficientă a biodiversității.

Notă. Studiile au fost realizate în cadrul subprogramului 011101 „*Abordări genetice și biotehnologice de management al agroecosistemelor în condițiile schimbărilor climatice*”, finanțat de Ministerul Educației și Cercetării al RM.

Referințe bibliografice

1. Adeyinka O. S., Tabassum B., Koloko B.L., Ogungbe I.V. Enhancing the quality of staple food crops through CRISPR/Cas-mediated site-directed mutagenesis. In: *Planta,* 2023, 257(4), p.78. doi: 10.1007/s00425-023-04110-6.
2. Bednarek P., Orłowska R. Plant tissue culture environment as a switch key of (epi)genetic changes. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2020, 140, pp.245-257.
3. Das D., Singha D. L., Paswan R.R. et al. Recent advancements in CRISPR/Cas technology for accelerated crop improvement. In: *Planta,* 2022, 255(5), p.109. doi: 10.1007/s00425-022-03894-3.
4. Dauer J., Hulting A., Carlson D. et al. Gene flow from single and stacked herbicide-resistant rice (*Oryza sativa*): modeling occurrence of multiple herbicide-resistant weedy rice. In: *Pest Manag Sci*, 2018, 74(2), pp.348–355.
5. Dong H. Application of genome editing techniques to regulate gene expression in crops. In: *BMC Plant Biol*, 2024, 24(1), p.100. doi: 10.1186/s12870-024-04786-2.
6. FAO/IAEA. Manual on Mutation Breeding - Third edition. Spencer-Lopes, M.M., Forster, B.P. and Jankuloski, L. (eds.), Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, Italy. 2018, 301 p. ISBN 978-92-5-130526-3.
7. Fehér A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? In: *Front Plant Sci*. 2019, 10, p.536. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536.
8. Felipe L., Ferreira G., Arruda H. et al. Principal component analysis: a natural approach to data exploration. In: *ACM Comput. Surv*, 2021, 54(4), pp.1–34.
9. Gao C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. In: *Cell*, 2021, 184(6), pp.1621–1635.
10. Ghosh A., Igamberdiev A.U., Debnath S.C. Tissue culture induced DNA methylation in crop plants. In: *Molecular Biology Reports*. 2021, 48(1), pp.823-841. https://doi.org/10.1007/s11033-020-06062-6.
11. http://mvd.iaea.org/ (vizitat 15.10.2023).
12. https://www.europarl.europa.eu/factsheets/ro/sheet/71/politica-de-mediu-principii-generale-si-cadrul-de-baza (vizitat 30.03.2024).
13. IPBES: Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. Eds. Brondizio E. S., Settele J., Díaz S., and Ngo H. T. IPBES secretariat, Bonn, Germany. 2019, 1148 p. https://doi.org/10.5281/zenodo.3831673.
14. Mikhno I., Koval V., Shvets G. et al. Discussion: Green economy in sustainable development and improvement of resource efficiency. In: *Central European Business Review*, 2021, 10(XX). https://doi.org/10.18267/j.cebr.252.

15. Montràs-Janer T., Suggitt A.J., Fox R. et al. Anthropogenic climate and land-use change drive short- and long-term biodiversity shifts across taxa. In: *Nature Ecology & Evolution*, 2024, 8, pp. 739–751. https://doi.org/10.1038/s41559-024-02326-7.
16. Parker W.B., Somers D.A., Wyse D.L. et al. Selection and characterization of sethoxydim-tolerant maize tissue cultures. In: *Plant Physiol*, 1990, 92, pp.1220–1225. doi: 10.1104/pp.92.4.1220.
17. Rai M. K. Somaclonal variation in improvement of agricultural crops: Recent progress. In: *Agricultural Biotechnology: Latest Research and Trends*, 2021 eBook, Chapter, 2021, pp.129-146. ISBN: 978-981-16-2338-7.
18. Rai M.K., Rathour R., Yadav S. et al. Somaclonal variation in fruit crop improvement. In: Somaclonal Variation: Basic and Practical Aspects. Sánchez-Romero, C. (eds) Springer, Cham., 2024, p.99-121. https://doi.org/10.1007/978-3-031-51626-9_6.
19. Sprinmann M., Clark M., Mason-D´Croz et al. Options for keeping the food system within environmental limits.In: *Nature*, 2018, 562(7728), pp.519–525.
20. Srigiri S. R., Dombrowsky I. Governance of the water-energy-food nexus for an integrated implementation of the 2030 Agenda. Conceptual and methodological framework for analysis. Bonn, 2021, 37 p. https://doi.org/10.23661/dp2.2021.
21. Strengthening actions for nature achieve the sustainable development goals. The 5th United Nation Environment Assembly. 8 February, 2022 - 2 March, 2022. https://www.unep.org/environmentassembly/unea5.
22. Ukhatova Y. V., Erastenkova M. V., Korshikova E. S. et al. Improvement of crops using the CRISPR/Cas system: New target genes. In: *Mol Biol* (Mosk), 2023, 57(3), pp.387-410.