

CZU 633.854.78:581.162.41

ASPECTE MORFOMETRICE ALE MEIOCITELOR ȘI GRĂUNCIOARELOR DE POLEN LA PLANTELE DE FLOAREA-SOARELUI CU ANDROSTERILITATE INDUSĂ

*Victoria NECHIFOR**Universitatea Academiei de Științe a Moldovei*

Abstract. Morphometric characterization is an important element in the study of dynamic cellular behavior in plant responses to biotic and abiotic stimuli. The aim of study was to determine the morphometric parameters of meiocytes and pollen grains in different phases of microsporogenesis in fertile and induced androsterility sunflower plants. Thus, the comparative morphometric analysis revealed the gametocidal effect of gibberellin that is manifested as abnormal changes in shape and volume of cells. These modifications lead to deficiencies in the integrity/rigidity and, respectively, in the functionality of the cell wall, as well as in the physical properties of the protoplasm. The low values of morphometric parameters were also correlated with the degree of sterility of pollen grains.

Key words: *Helianthus annuus*; Cell morphology; Pollen fertility; Induced androsterility.

Rezumat. Caracterizarea morfometrică este un element important în studiul proceselor celulare dinamice ca răspuns la stimulii biotici și abiotici. Scopul studiului constă în determinarea parametrilor morfometrici ai meiocitelor și grăuncioarelor de polen în diferite faze ale microsporogenezei la plantele de floarea-soarelui fertile și cu androsterilitate indusă. Astfel, analiza morfometrică comparativă a relevat efectul gametocid al giberelinei exprimat prin schimbările anormale ale formei și volumului celulelor. Aceste modificări induc deficiențe atât în integritatea/rigiditatea și, respectiv, în funcționalitatea peretelui celular, cât și în proprietățile fizice ale protoplasmei. De asemenea, valorile scăzute ale parametrilor morfometrici au fost corelate cu gradul de sterilitate al grăuncioarelor de polen.

Cuvinte-cheie: *Helianthus annuus*; Morfologie celulară; Fertilitatea polenului; Androsterilitate indusă.

INTRODUCERE

Forma celulei este considerată un indicator important al proceselor intracelulare, fiind asociată cu un nivel înalt de specificitate în funcție de tipul celulelor organelor și țesuturilor (Pelt, J. van et al. 2004). Morfologia celulară este dependentă cauzal de interacțiunile dinamice și de echilibrul dintre forțele care apar între membranele citoscheletului, organite și complexe de adeziune ce interrelaționează cu matricea extracelulară în rezultatul acțiunii sistemelor de transducție a semnalului de reglare (Watson, P.A. 1991).

Conceptul de evaluare morfometrică a formelor celulare a fost introdus pentru prima dată la începutul anilor 1900, presupunând studii asupra volumului celular (Jacob, W. 1925), asupra raportului dintre acesta și dimensiunea nucleului (Heiberg, K.H. 1929). Cu toate acestea, instrumentele celulare de analiză morfometrică au început să fie utilizate în identificarea variațiilor fenotipice celulare de către cercetători doar după 1980.

Analiza morfologică a fost folosită cu succes la evaluarea diferențierii celulelor (Wan, L.Q. et al. 2010) și la corelarea formei cu funcția acestora (Watson, P.A. 1991; Costa, L.F. et al. 2002). Identificarea interconexiunilor funcție-structură-morfologie în scopul evidențierii și asocierii formelor celulare cu procesele biologice a fost raportată în cazul proliferării (Chen, M. et al. 1997), diferențierii (Watt, F.M. 1988), migrației celulelor, precum și cu referire la motilitatea și dinamica creșterii acestora (Keren, K. 2008; Xiong, Y., Iglesias, P.A. 2010).

Date privind asocierea corelațiilor dintre parametrii morfometrici și manifestarea funcției au fost raportate, în special, la celulele umane (Yu, H. et al. 2013). Studiind procesul de reproducere la animale, M.N. Sundararaman (2007) și P. de Paz (2011) au demonstrat că parametrii morfologici ai gameților masculini pot fi utilizați în calitate de indicatori prognostici ai gradului de fertilitate.

În ceea ce privește plantele, spre deosebire de regnul animal, există foarte puține informații referitoare la analiza morfometrică a celulelor sexuale. Astfel de cercetări au fost realizate în scopul asocierii formei și dimensiunii tetradelor și grăuncioarelor de polen cu gradul de fertilitate al acestora (Rhee, N.K. 2005). Deși se cunoaște că modificarea formei celulelor poate influența numeroase funcții și procese fiziologice, mecanismele care stau la baza acestor relații interdependente nu sunt pe deplin înțelese.

Având în vedere cele expuse, scopul lucrării constă în elucidarea unor aspecte morfometrice ale meiocitelor și grăuncioarelor de polen la plantele de floarea-soarelui cu androsterilitate indusă.

MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul biologic de cercetare a inclus linia fertilă de floarea-soarelui SW501 din colecția de germoplasmă a companiei "AȘP MAGROSELECT" din Soroca, care a fost utilizată în calitate de martor, și plante cu androsterilitate indusă (ASI).

Pentru inducerea androsterilității, un eșantion de 50-55 de plante a fost stropit cu soluție apoasă de acid giberelic AG₃ (Sigma) în concentrație de 0,01%, direct pe inflorescența în faza de butonizare R-2 (Schneider, A. 1981). În cazul martorului, la această etapă s-a folosit apa distilată.

Analiza citologică a preparatelor obținute din antere în diferite stadii de dezvoltare a celulelor mamă polinice – leptoten, pahiten, diviziuni, tetrade, microspor și grăuncioare de polen – s-a realizat prin microscopie fonică (Duca, M. 2013). Butoanele florale au fost fixate într-o soluție de etanol cu acid acetic (3:1) pentru 24 ore la temperatura camerei, apoi au fost transferate în alcool etilic de 70% și păstrate la 4°C, ulterior fiind colorate cu carmin acetic. Au fost studiate 15 antere extrase de la 5 butoni floralți (1,5-4,0 mm), din 3 inflorescențe (3 repetiții individuale). Observațiile microscopice și microfotografiile s-au efectuat cu microscopul fonic (XSZ-206T, Ningbo Wason Optical Instrument Co.,Ltd) dotat cu camera CCD (MEM1300, Future Optics Sci. & Tech. Co., Ltd). Preparatele citologice au fost analizate la obiective cu factorul de mărire 40X și 100X.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Studiul computerizat al imaginilor microscopice fotonice a permis identificarea valorilor pentru arie, perimetru și lungime la meiocitele și grăuncioarele de polen colectate din anterele plantelor fertile (plantele martor) și cele cu ASI ale liniei SW501 la diferite faze de dezvoltare (leptoten, pahiten, diviziuni, tetrade și microspor). Abordarea descriptivă a profilului meiotic completată cu parametrii dimensionali sporește relevanța caracterizării microsporogenezei la plantele androsterile în raport cu cele fertile, oferind criterii cuantificabile, care pot argumenta o diferențiere a anomaliei în analiza citologică.

Astfel, fenotipul meiotic al celulelor mamă polinice și al microsporilor la plantele martor a prezentat formă celulară regulată (fig. 1.I), comparativ cu cele tratate, la care s-au evidențiat modificări în morfologie și dimensiune (fig. 1.II).

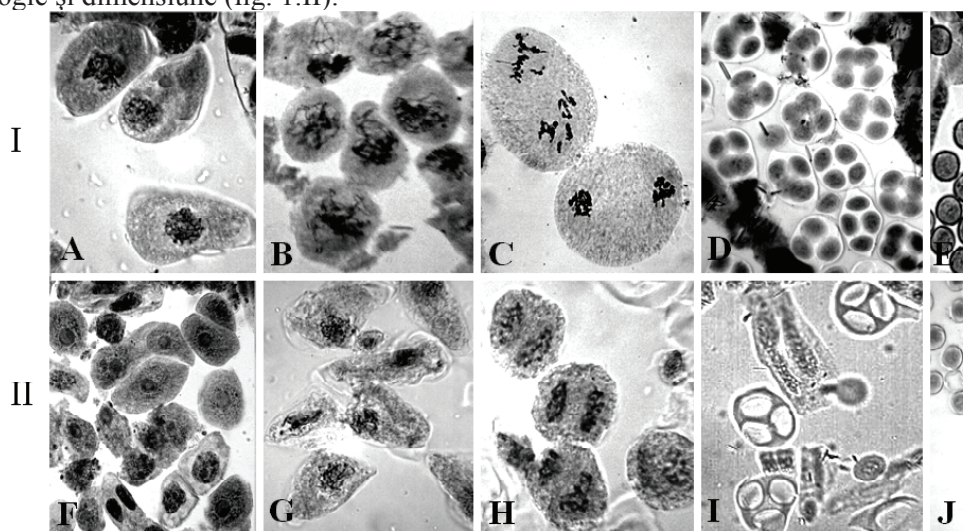


Figura 1. Celule-mamă polen în diferite etape ale microsporogenezei. I – plante fertile, II – plante cu ASI cu giberelină; A, F - leptoten; B, G - pahiten; C, H - diviziuni; D, I - tetrade; E, J – microspori x1600 (C, F); x640 (A, B, D, E, G, H, I, J).

Aria celulelor la plantele martor este de 1106,9 μm^2 în leptoten și de 1110,6 de μm^2 în pahiten (fig. 2.a). Aplicarea exogenă a giberelinei a determinat micșorarea suprafeței celulare în fazele timpurii ale meiozei, astfel încât, la varianta tratată, aria a fost de 955,9 μm^2 în leptoten și de 965,3 μm^2 în pahiten.

În faza de diviziuni, la varianta martor, meiocitele indică valori mai mari (1256,9 μm^2), care ulterior

se micșorează nesemnificativ până la 1193,8 μm^2 datorită transformărilor morfo-fiziologice care au loc la formarea tetradelor.

Ca și în fazele precedente, la plantele cu ASI se păstrează o tendință de micșorare a valorilor pentru arie în faza de diviziuni – 1153,5 μm^2 – și în faza de tetrade – 1145,6 μm^2 .

Microsporii tineri, eliberați din tetrade, au prezentat o suprafață de 311,8 μm^2 la varianta martor și una comparativ mai mică, de 291,5 μm^2 , la cea tratată cu AG3.

Un alt parametru analizat este perimetrul celulelor. La plantele de control, în decursul celor două diviziuni meiotice (leptoten – 120,3 μm și tetrade – 128,4 μm) până la faza de microspor, valorile perimetrului celulelor variază foarte puțin (cu doar 8 μm), indicând o tendință de creștere treptată, similară celei determinate la măsurarea ariei celulelor analizate. La plantele tratate, datorită efectului gametocid al gibberelinei, care induce modificări în morfologia celulelor, datele obținute pentru perimetrul celulelor în decursul celor două diviziuni sunt cuprinse între 95,8 μm (leptoten) și 115,2 μm (tetrade).

În cazul microsporilor, la plantele de control perimetrul a indicat valori de 55,2 μm , iar la varianta tratată – cu 7 μm mai puțin (fig. 2.b).

Al treilea indice analizat este lungimea, care, la plantele de control, a variat neesențial în primele faze ale microsporogenezei (leptoten – 41,8 μm și tetrade – 47,3 μm). La plantele cu ASI, ca și în cazul celorlalți parametri analizați, lungimea celulelor a fost mai mică, astfel că în faza leptoten celulele-mamă polinice au avut 34,7 μm , iar în tetrade – 44,3 μm .

În următoarea fază a microsporogenezei, micșorarea diametrului microsporilor de la 21,1 μm , la varianta martor, până la 16,4 μm , la cea tratată, a fost asociată cu inducerea androsterilității și formarea polenului steril (fig. 2.c).

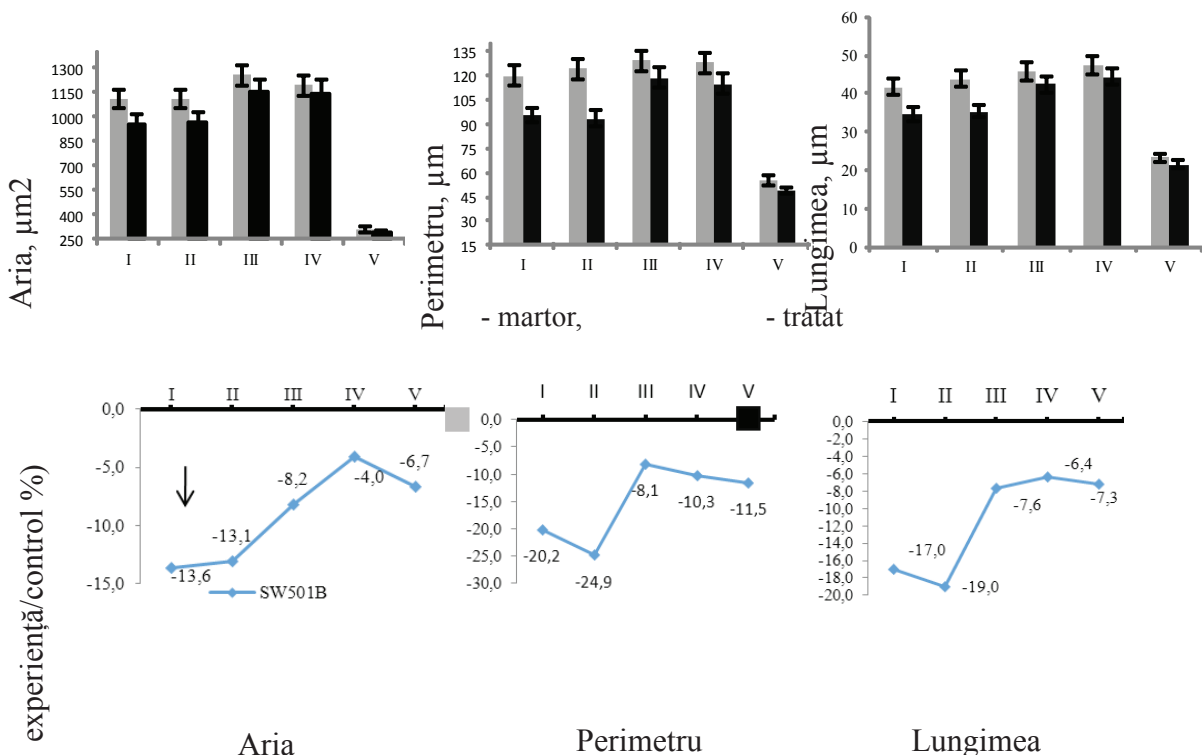


Figura 2. Analiza comparativă a parametrilor morfometrici ai meiocitelor și microsporilor la plantele cu ASI tratate cu AG₃ în raport cu cele fertile

Notă: Fazele microsporogenezei: I-leptoten; II-pahiten; III-diviziuni; IV-tetrade; V-microspor. Axa ordonatelor: diferența experiență-control, unde controlul este considerat 100%

Generalizând datele obținute în studiu, se poate constata că celulele cu cele mai reduse valori ale indicilor studiați, în raport cu varianta martor, au fost observate în primele două faze ale meiozei. Astfel, în leptoten aria s-a micșorat cu 13%, perimetrul – cu 20% și lungimea – cu 17%, iar în faza pahiten, pa-

rametrii numiți s-au redus cu 13%, 25% și, respectiv, cu 19% (fig. 2). Este important de menționat faptul că între acești trei parametri este o interdependență puternică, coeficientul de corelație (r) dintre valorile procentuale ale diferențelor față de martor fiind 0,85 în cazul relației arie–perimetru, 0,94 în cazul relației arie–lungime și 0,97 în cazul relației perimetru–lungime (fig. 2). Modificările anormale în fenotipul celulelor-mamă polinice sunt evidente și datorită valorilor mai mici ale coeficientului de corelație dintre arie și perimetru. Acest fapt indică asupra unui contur al meiocitelor, cu invaginări, reprezentând astfel anomalii de formă și volum cauzate de acțiunea negativă a giberelinei.

Modificările morfologice care pun în evidență efectul gametocid al acidului giberelic în primele faze de dezvoltare a gameților masculini se constată și în faza de maturizare a acestora. Astfel, la plantele androfertile din varianta de control grăuncioarele de polen au măsurat în diametru 33,4 μm . În variantele tratate chimic acest parametru s-a micșorat cu 3%. De asemenea, în cazuri separate, a fost observat un număr mic, nereprezentativ, de microspori sterili cu vacuole exagerat de mari, condiționând astfel și un diametru mai mare comparativ cu martorul (fig. 3). Aceste variații în dimensiuni ale parametrilor morfometrici în raport cu valorile caracteristice speciei/genotipului confirmă o dată în plus că datele morfometrice pot fi utile în determinarea sterilității plantelor.

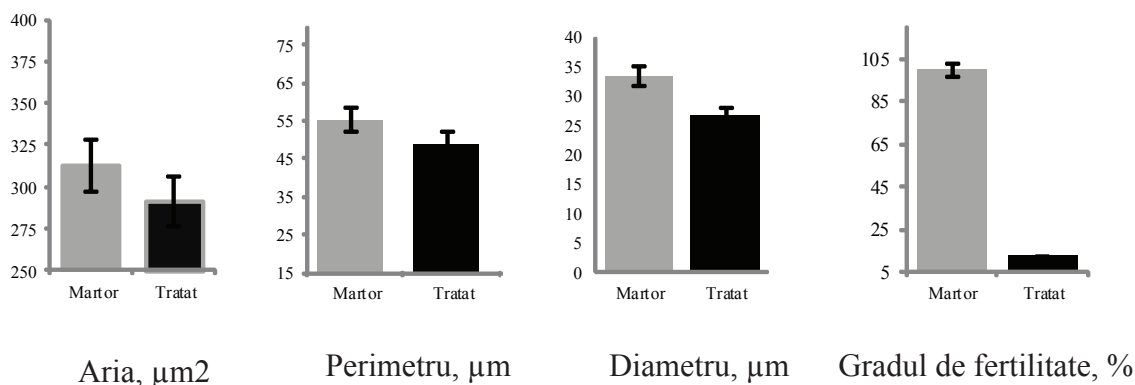


Figura 3. Parametrii dimensionali ai grăuncioarelor de polen și gradul de fertilitate (%)

Rezultate similare au fost raportate la hibridii interspecifici de crini, la care grăuncioarele de polen sterile au demonstrat dimensiuni mai reduse comparativ cu cele fertile (Rhee, H.K. 2005). Analiza caracterelor morfologice ale polenului a fost realizată și la unele forme mutante de tomate, determinându-se că eroarea foarte mare a mediilor ariei, perimetrului și diametrului grăuncioarelor de polen indică eterogenitatea caracterului analizat, la care și variabilitatea este foarte mare (Toderaș, L. 1992).

Analiza morfometrică comparativă a meiocitelor și grăuncioarelor de polen la plantele de floarea-soarelui tratate cu giberelină a evidențiat efectul gametocid exprimat prin modificarea anormală a conturului/formei și volumului celulelor, ceea ce presupune prezența unor deficiențe atât la nivelul integrității/rigidității și, respectiv, al funcționalității peretelui celular, cât și la nivelul proprietăților fizice ale protoplasmiei.

CONCLUZII

Studiul citologic al microsporogenezei la plantele de floarea-soarelui (SW501) cu adrosterilitate indusă de acidul giberelic, aplicat în concentrația de 0,01%, a pus în evidență aspecte morfometrice anormale ale meiocitelor și grăuncioarelor de polen specifice fenotipului steril.

În primele faze de dezvoltare a polenului (meiocit, tetradă, microspor), parametrii analizați au demonstrat devieri de la normă preponderent la nivel de dimensiuni și devieri mai puțin evidente în configurația geometrică care determină forma celulei.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- BONCIU, E. (2013). Aspects of the pollen grains diameter variability and the pollen viability to some sunflower genotypes. In: Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology, vol. 17(1), pp. 161- 165. ISSN 2066-1797.
- CHEN, M. et al. (1997). Geometric control of cell life and death. In: Science, vol. 276(30 may), pp. 1425-1428. ISSN 0036-8075.
- COSTA, L.F. et al. (2002). A shape analysis framework for neuromorphometry. In: Network: Comput. Neural Syst., vol. 13, pp. 283-310. DOI 10.1088/0954-898X/13/3/303

4. DUCA, Maria et al. (2013). Corelarea dimensiunii florilor tubulare și anterelor cu fazele microsporogenei și microgametogenezei la *Helianthus annuus L.* In: Lucrări științifice, UASM, vol. 39: Agronomie și ecologie, pp. 59-63. ISBN 978-9975-64-250-7.
5. JACOB, W. (1925). Uber das rhythmische wachstum der zellen durch verdopplung ihres volumens. In: Roux Archiv Entwicklungs Mechanik vol. 106: pp. 124-192.
6. HEIBERG, K.H. (1929). Ueber die zahl human epidermal keratinocytes. Proc Natlilhes volumens. Roux Archiv Entwicklungs Integr Biol., vol. 2, pp. 561-567.
7. KEREN, K. et al. (2008). Mechanism of shape determination in motile cells. In: Nature, vol. 453, pp. 475-480. DOI 10.1038/nature06952.
8. PAZ, P. de, et al. (2011). The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. In: Theriogenology, vol. 76, pp. 1313-1325. ISSN 0093-691X.
9. PELT, J. van, SCHIERWAGEN, A. (2004). Morphological analysis and modeling of neuronal dendrites. In: Math Biosci, vol. 188: pp. 147-155.
10. RHEE, H.K. et al. (2005). Comparison of pollen morphology in interspecific hybrid lilies after in vitro chromosome doubling. In: Acta Horticulturae, vol. 673, pp. 639-643. ISSN 0567-7572.
11. SCHNEITER, A.A. (1981). Description of Sunflower Growth Stages. In: Crop Science, vol. 21(6), pp. 901-903. DOI 10.2135/cropsci1981.0011183X002100060024x.
12. SINGHAL, V.K. (2008). Impact of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of *Himalayan poppy (Meconopsis aculeata Royle)*. In: Journal of Biosciences, vol. 33(3), pp. 371-380. ISSN 0250-5991.
13. SUNDARARAMAN, M.N. (2007). Analyses of Morphological and Morphometrical Deviations of Bull Spermatozoa by Computer Assisted Semen Analysis Technique. In: Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, vol. 2, pp. 196-204. ISSN 1683-9919.
14. TODERAȘ, L. (1992). Studii citoembriologice la formele mutante de tomate. In: Congresul I al botaniștilor din Moldova, 5-6 noiem., Chișinău, pp. 10-12. ISBN 5-376-01849-0.
15. WAN, L.Q., et al. (2010). Geometric control of human stem cell morphology and differentiation. In: Integrative Biology (Camb.), vol. 2, pp. 346-353. DOI 10.1039/c0ib00016g.
16. WATSON, P.A. (1991). Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation. In: FASEB Journal, vol. 5, pp. 2013-2019. ISSN 0892-6638.
17. WATT, F.M. et al. (1988). Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. In: Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 85, pp. 5576-5580. ISSN 0027-8424.
18. XIONG, Y., IGLESIAS, P.A. (2010). Tools for analyzing cell shape changes during chemotaxis. In: Integrative Biology (Camb.), vol. 2, pp. 561-567. DOI 10.1039/c0ib00036a.
19. YU, H. et al. (2013). Functional Morphometric Analysis in Cellular Behaviors: Shape and Size Matter. In: Advanced Healthcare Materials, vol. 2(9), pp. 1188-1197. ISSN 2192-2640.

Data prezentării articolului: 20.09.2017

Data acceptării articolului: 21.10.2017