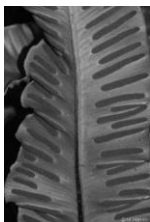


UTILIZAREA CULTURII DE PTERIDOSPORI PENTRU ILUSTRAREA UNOR PROCESE BIOLOGICE

Liliana Cristina SOARE ¹



Pentru investigarea și ilustrarea diferitelor procese biologice, cultura *in vitro* are o importanță deosebită. Ferigile constituie sisteme experimentale versatile pentru studierea morfogenezei plantelor vasculare (DYER, 1979), fiind utilizate ca material experimental atât în formă unicelulară, în stadiul de spor, cât și ca țesuturi cu diferențiere celulară complexă (NAKAMURA și MAEDA, 1994). Gametofitul sau protalul ferigilor este efectiv considerat un „instrument” pedagogic interesant atât pentru experimente mai simple accesibile elevilor și studenților cât și pentru diferite proiecte de cercetare.

Pentru obținerea gametofitului pteridofitelor se realizează culturi de spori – pteridospori pe diferite medii nutritive. Cultura de pteridospori reprezintă metoda cea mai veche de cercetare a morfogenezei gametofitului. A fost menționată pentru prima dată de către MORISON (1699) în lucrarea „Historia plantarum”, autorul observând faptul ca sporii de „Scolopendre” – *Asplenium scolopendrium* cultivați pe pământ umed produc numeroase plantule, care au ca debut o delicată frunză rotundă – protalul. Cultura sporilor se poate realiza atât în laboratoare moderne de culturi *in vitro*, cât și în laboratoare mai puțin dotate, materialul obținut ajutând cadrul didactic sa ilustreze elevilor sau studenților diferite procese biologice.

Etapele realizării unei culturi de spori sunt:

1. identificarea speciei de la care se colectează sporii,
2. sterilizarea frunzelor purtătoare de sporangi maturi,
3. colectarea sporilor,
4. cultivarea sporilor pe mediul de cultură.

1. Identificarea speciei. Sporii se pot colecta de la plante provenite din mediul natural sau de la specii de ferigi aflate în colecțiile grădinilor botanice. Pentru identificarea speciei alese se utilizează diferite determinatoare, unul dintre cele mai noi fiind „Flora ilustrată a României – *Pteridophyta et Spermatophyta*” (CIOCÂRLAN, 2000). Pentru determinarea speciilor care nu vegetează în România se poate utiliza „Flora Europaea” (TUTIN și colab., 1993).

2. Sterilizarea frunzelor purtătoare de sporangi maturi. După ce specia aleasă a fost determinată frunza se fragmentează și apoi se hidratează menținând fragmentele în curent de apă, timp de o jumătate de oră, într-un pahar Berzelius acoperit cu o bucată de tifon. Sterilizarea

¹Universitatea din Pitești.

se face cu hipoclorit de calciu 6%, preparat înainte utilizării sau cu apă oxigenată 10% (CACHIȚĂ-COSMA și PETRESCU, 1985; CACHIȚĂ-COSMA, 1987; FAY, 1994; FERNÁNDEZ și REVILLA, 2003). Timpul de expunere la agentul sterilizant poate fi cuprins între 3 și 10 minute, fiind mai mic în cazul materialului provenit din sere, care are o încărcătură mai mică de germeni și mai mare în cazul celui provenit din mediul natural. După sterilizare, fragmentele de frunze se spală de trei ori cu apă distilată sterilă pentru înlăturarea completă a agentului sterilizant.

3. Colectarea sporilor. Fragmentele de frunze sterilizate se pun în cutii Petri sterile, cu fața inferioară (pe care se află sporangii) în jos. Aici se mențin până la eliberarea sporilor din sporangi, sporii observându-se sub forma unei pulberi fine.

4. Cultivarea sporilor pe mediul de cultură. Sporii obținuți se pot cultiva pe diferite medii nutritive, atât lichide cât și solide. Unul dintre cele mai populare medii lichide, ușor de preparat, este mediul KNOP (1865). După preparare, mediul se sterilizează și apoi se repartizează în cutii Petri sterile. Sporii se cultivă pe suprafața mediului, cutiile Petri se acoperă cu capacul și se înfășoară în folie adezivă transparentă pentru a reduce evaporarea apei din mediu. Cutiile Petri se plasează într-o cameră de creștere la $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ și fotoperioadă de 16 ore lumină / 8 ore întuneric (BERTRAND și colab., 1999; FERNÁNDEZ și colab., 1999, etc.) sau, în lipsa acesteia, într-o cameră obișnuită, unde sunt menținute la lumină solară indirectă și la o temperatură de $22-30^{\circ}\text{C}$ (VLADESCO, 1934). Culturile realizate sunt analizate periodic, în diferitele stadii de diferențiere a gametofitului fiind observate diferite procese biologice.

Procese biologice ce pot fi ilustrate pe parcursul diferențierii gametofitului

- Diviziunea mitotică inegală a celulelor. Se observă în cazul primei diviziuni mitotice a sporului; în urma acestei diviziuni se formează două celule inegale: cea mai mare fiind inițiala protalului, iar cea mai mică, inițiala rizoidului. În urma unor diviziuni mitotice inegale se formează toți rizoizii protalieni, dar și trihomii protalieni.
- Constituirea filamentului protalian, alcătuit dintr-un număr variabil de celule, în funcție de specie. Se face prin diviziuni mitotice ale inițialei protalului, diviziuni care au loc în plan paralel cu planul ecuatorial al sporului.
- Diviziunea cloroplastelor sau cloroplastotomia. Celulele care alcătuiesc gametofitul conțin numeroase cloroplaste, motiv pentru care se mai numesc și clorocite protaliene. Cloroplastele care se divid se alungesc și se strangulează în regiunea mediană formându-se în final două cloroplaste.
- Formarea plăcii (lamei) protaliene. Se observă că trecerea de la stadiul de filament protalian la cel de lamă (placă) protaliană se face prin diviziunea longitudinală a unor celule distale ale filamentului. În unele cazuri se formează chiar o celulă meristematică în formă de pană sau ic.
- Formarea și alcătuirea protalului cordat. Se poate observa înlocuirea celulei meristemice apicale cu un meristem multicelular situat în scobitura protalului.
- Formarea, alcătuirea și localizarea anteridiilor.

- Eliberarea anterozoizilor din anteridie și deplasarea acestora pe suprafața gametofitului cu ajutorul flagelilor.
- Formarea, alcătuirea și localizarea arhegoanelor.
- Formarea, alcătuirea și localizarea trihomilor protalieni, la speciile la care aceștia sunt prezenți.
- Influența diferiților factori asupra diferențierii gametofitului, etc.

Bibliografie

1. BERTRAND, A.M., ALBUERNE, M.A., FERNÁNDEZ, H., GONZÁLEZ, A., SÁNCHEZ-TAMÉS, R. 1999. *In vitro organogenesis of Polypodium cambricum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 57: 65-69.
2. CACHIȚĂ COSMA, D. 1987. *Metode in vitro la plantele de cultură – baze teoretice și practice*. Editura Ceres, București, 274 pp.
3. CACHIȚĂ COSMA, D. , PETRESCU C. 1985. *Curs practic de culturi de țesuturi „in vitro” cu aplicații în horticultură și floricultură*. Tipografia Institutului Agronomic „N. Bălcescu”, București, 284 pp.
4. CIOCÂRLAN V. 2000. *Flora ilustrată a României. Pteridophyta et Spermatophyta*. Editura Ceres, București, 1139 pp.
5. DYER, A.F. 1979. *The experimental biology of ferns*. Trans. Bot. Soc. Edinb. 43: 75-90.
6. FAY, M.F. 1994. *In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservation?* Biodiversity and Conservation. 3: 176-183.
7. FERNÁNDEZ H., BERTRAND A.M., SÁNCHEZ-TAMÉS R. 1999. *Biological and nutritional aspect involved in fern multiplication*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 56: 211-214.
8. FERNÁNDEZ H., REVILLA M.A. 2003. *In vitro culture of ornamental ferns*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73: 1-13.
9. KNOP W. 1865. *Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen* Landwirtsch Vers. Stn. 7: 93-107.
10. MORISON. *Historia plantarum*. Oxford III, 55 pp.
11. NAKAMURA, M. și MAEDA. M. 1994. *Isolation and culture of protoplasts from young sporophytes of Salvinia natans aseptically obtained by co-culture of female and male gametophytes*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 36: 237-242.
12. TUTIN T.G., BURGESS N.A., CHATER A.O., EDMONSON J.R., HEYWOOD V.H., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A. 1993. *Flora Europaea*. 2nd ed. Vol. 1. *Psilotaceae to Platanaceae*. Cambridge: Cambridge University Press, 581 pp.
13. VLADESCO, A. 1934. *Recherches morphologiques et expérimentales sur l'embryogénie et l'organogénie des fougères leptosporangiées*. Imprimerie André Lesot, Paris, 140 pp.