

ASPECTE BIOCHIMICE ȘI ULTRASTRUCTURALE PE PARCURSUL STRATIFICĂRII SEMINTELOR DE MĂR

O. TOMA*, NAELA COSTICĂ*, AL. DASCALIUC**

Key words: stratification, apple seeds, ultrastructure, aminoacides.

Abstracts: The work is focused on ultrastructural and biochemical study of stratificated (+4 °C) apple seeds of *Malus pumilla* Mill.

Introducere

Între etapa embrionară și cea de juvenilitate s-a consolidat filogenetic starea de repaus, cu durată variabilă în funcție de specie [9]. În principiu, perioada latentă este caracteristică practic pentru toate plantele superioare. Această perioadă de repaus vegetativ, cuprinsă între primele două etape ale ontogenezei plantelor – caracterizate printr-o intensă activitate biochimică – se desfășoară în timpul maturării complete a semințelor și reprezintă pârguia evolutivă necesară pentru menținerea vitalității embrionului în condițiile nefavorabile ale mediului înconjurător [8]. Repausul vegetativ este cauzat de imaturitatea fiziologică a embrionului (embrion rudimentar), rezistența mecanică și impermeabilitatea pentru apă și gaze a învelișurilor seminței precum și de prezența unor inhibitori ai germinării.

Aceste bariere sunt anihilate prin stratificare, care inițiază astfel trecerea de la etapa embrionară la cea de juvenilitate, prin crearea condițiilor de realizare a proceselor fiziologice, morfologice și biochimice care induc germinarea, prin trecerea embrionului seminal din starea de repaus într-o stare activă de creștere. Modificările ce au loc în timpul stratificării se produc în condiții diferite de la o specie la alta și în principiu acești factori, în ansamblu, sunt legați de adaptarea cât mai amplă a speciei la mediu.

La nivelul semințelor se produc diverse modificări pe tot parcursul perioadei de stratificare, când expresia genelor este reprogramată. În cadrul mai restrâns al biochimiei semințelor [3], la nivelul embrionului – în ax (în timpul stratificării) și în cotiledoane (în timpul stratificării și germinării) – au loc schimbări structurale [7] care țin de degradarea substratului proteic [4] și substratului lipidic [6], de apariția și degradarea

*Universitatea „Al. I. Cuza” Iași

**Institutul de Fiziologie a Plantelor – Chișinău

amidonului, deamidarea proteinelor membranare [12]. de modificări în conținutul enzimatic, în cel al aminoacizilor și substanțelor de depozitare, precum și al acizilor nucleici.

În anumite condiții, prin degradarea proteinelor de rezervă rezultă energia necesară întreținerii proceselor vitale.

Investigațiile de ultrastructură — prin intermediul microscopiei electronice prin transmisie — nu au fost până în prezent orientate spre intimitatea acestui complex proces de stratificare. Din aceste rațiuni ne-am propus să abordăm câteva aspecte de ultrastructură a embrionului semințelor de măr pe parcursul stratificării și să le corelăm cu o serie de investigații biochimice referitoare la bilanțul aminoacizilor care intervin în acest proces.

Material și metode de cercetare

Embrionii semințelor soiului de măr *Slava pobediteliam* (*Slava peremojiam*) din Republica Moldova, aparținând speciei *Malus pumilla* Mill. au fost fixați, conform metodicii cunoscute [11], în glutaraldehidă 6 % și tetraoxid de osmiu 1 % . deshidratați în serii crescânde de alcool și îmbibați în rășini. Secțiunile ultrafine au fost efectuate la ultramicrotumul „LKB “, contrastate cu uranilacetat și citrat de sodiu și cercetate la microscopul electronic prin transmisie „EM 125 K“.

Ulterior, în cadrul investigațiilor biochimice, pentru fiecare dintre probele studiate (axe embrionare și cotiledoane) înainte și la sfârșitul stratificării (control-K și STR4) precum și pentru cotiledoanele, tigela și radicaula apărute în urma germinării (GER), într-o primă etapă s-a determinat azotul total (Nt) - după metoda micro-Chieldal - și s-a calculat cantitatea procentuală de proteine (Nt*6,25 %) conform literaturii [10]. După aceasta, probele au fost hidrolizate în prezență de acid clorhidric (HCl) 6n, timp de șase ore, sub presiune (2 atm), într-un autoclav de tip „GK 200“, în vederea descompunerii proteinelor în acizi aminici. Ulterior, probele au fost analizate prin intermediul anali-zorului automat de aminoacizi de tip „ T 339“. Datele au fost preluate pe un înregistrator de tip „Line Recorder TZ 4100-4003 Multirange“ și prelucrate de un integrator de tip

„Digital Integrator-model 26 C“, în vederea calculării suprafețelor pic-urilor (în unități relative) și transmiterii informațiilor către un calculator (IBM-PC- XT), pentru a se calcula exact conținutul procentual (%) fiecărui aminoacid în parte.

Rezultate și discuții

Microscopia electronică prin transmisie, aplicată restrâns ca metodă de studiu auxiliară metodei or biochimice, a permis vizualizarea componentelor ultrastructurale embrionare – pe parcursul stratificării – conducând astfel și la o confirmare a datelor biochimice obținute ulterior [14] la diiferite genotipuri ce aparțin speciei *Malus pumilla* Mill.

Investigațiile asupra semințelor fructelor aparținând soiului *Slava pobediteliam*, la cele două extremități ale intervalului de stratificare, au vizat în special porțiunea mediană a axului embrionar și mai puțin cotiledoanele - cunoscute deja ca prezentând depozite proteice foarte numeroase și de dimensiuni mari, numeroși sferosomi, și fiind lipsite de ribozomi. Celulele axului embrionar, la începutul intervalului de stratificare (Fig. 1a, b) prezintă din punct de vedere ultrastructural grăunțioare mari de aleuronă (Ga), numeroși sferosomi (S), ribozomi liberi (R) puțini și rare canale de reticul endoplasmatic (RE). Numărul mic al ribozomilor, în majoritate liberi, absența poliribozomilor și a reticulului endoplasmatic granular (REG) reprezintă indicii ai inactivării proteosintezei. Dimensiunile și numărul mare al incluziunilor proteice și lipidice semnifică gradul maxim de imobilizare a acestor rezerve la această etapă. Spre finalul intervalului de stratificare (Fig 2a, b) se constată mobilizarea rezervelor lipidice prin degradarea sferosomilor (Fig 2a, vezi săgeata) și reducerea dimensională a granulelor de aleuronă, ceea ce presupune implicarea unor sisteme enzimatică în aceste procese hidrolitice. Concomitent, crește numărul ribozomilor (polizomi) și a canalelor REG, aspecte legate de o creștere a ratei de proteosinteză, probabil implicată fie în sinteza enzimelor proteolitice care continuă degradarea rezervelor proteice, fie în edificarea ulterioară a unor precursori biostructur-rali.

Datele obținute, în concordanță cu cele din literatură [13], arată că depozitele lipidice sunt primele mobilizate pe parcursul stratificării, ulterior fiind hidrolizate proteinele și că aceste procese, determinate enzimatic, implică o participare ribozomală (dovadă, creșterea numărului de ribozomi). Declanșarea proceselor hidrolitice are loc mai întâi la nivelul axului embrionar și apoi în cotiledoane.

În urma hidrolizei proteice s-a observat că întreaga cantitate (%) de azot total (Nt), atât din axul embrionar, cât și din cotiledoane, se regăsește în valori mai mici la sfârșitul întregii perioade de stratificare (STR 4) față de control (K) - (Tab. I); la unele componente structurale ale semințelor după germinare (GER), conținutul de Nt scade de la 4,48% (cotiledoane) la 1,27% (tigelă). Paralel cu aceste involuții ale Nt regăsim și variațiile conținutului proteic (Tab. I) pe perioada stratificării și anume: în axul embrionar

de la 21,00% (K) la 20,38% (STR 4), iar în cotiledoane de la 34,00% (K) la 30,38% (STR 4), în cotiledoane și țigelă (la începutul germinării-GER), de 28,00% și respectiv 7,94%.

Din punct de vedere al conținutului în aminoacizi, constatăm că față de nivelul din probele de control (K), acesta descrește repede, deoarece proteinele se degadează din depozite; o mare parte din aminoacizi încep să scadă în conținut și ca urmare a reasamblării în diverse structuri specifice embrionului pe parcursul creșterii, precum și formării aminoacizilor liberi.

Astfel, în axul embrionar, spre sfârșitul stratificării (STR 4) numai în cazul treoninei, alaninei, izoleucinei și argininei, nivelul lor procentual este mai ridicat față de K, în timp ce conținutul celorlalți 11 aminoacizi se regăsește sub formă diminuată. Același lucru se constată și în cotiledoane, dar în acest caz numai la treonină, arginină și – în plus – la serină se mai constată un nivel puțin mai ridicat la STR 4 față de K, restul aminoacizilor urmând aceleași legități menționate anterior.

Valorile cele mai ridicate în conținutul aminoacizilor le întâlnim la acidul glutamic (3,89%), acidul aspartic (2,02%), arginină (1,56%), glicină (1,53%), prolină (1,36%), în cazul axului embrionar, spre deosebire de cotiledoane, unde conținutul (%) este mai ridicat la acidul glutamic (6,17%), arginină (3,82%), leucină (3,16%), acid aspartic și glicină (2,98%) și prolină (2,14%). La polul opus, cu cele mai mici valori, se înregistrează metionina (0,29%), tirozina (0,36%), histidina (0,56%), treonina (0,65%), serina (0,68%), fenilalanina (0,72%), lizina (0,74%) și valina (0,76%) – în cazul axului embrionar, în timp ce în cotiledoane nivelul procentual este ceva mai ridicat, în concordanță cu nivelul general mai ridicat al proteinelor în țesuturi, valori sub 1% întâlnindu-se doar la metionină (0,37%), serină (0,75%), treonină (0,68%), lizină (0,96%) și tirozină (0,99%).

Referitor la componentele structurale ale seminței, de la începutul germinării, se constată o firească tendință de descreștere a conținutului de aminoacizi dinspre cotiledoane spre țigelă. Și aici, în primele două cazuri, predomină fracțiile acidului glutamic (2,39% și, respectiv, 1,06%), leucinei (2,68% și, respectiv, 0,86%) și acidului aspartic (2,65% și, respectiv, 0,77%).

La cotiledoane, în special, este de remarcat faptul că în timp ce conținutul unor aminoacizi (acidul glutamic, serina și prolina) crește relativ brusc odată cu declansarea germinării, cel al altor aminoacizi (tirozina, histidina, lizina) manifestă o descreștere pronunțată. De aici reiese că, la nivelul cotiledoanelor, la începutul germinării au loc două procese distincte: (1) procesul de degradare a proteinelor de rezervă și formarea unor aminoacizi liberi, fapt care duce la diminuarea conținutului aminoacizilor studiați;

(2) transformarea reciprocă a acestor aminoacizi, unii în alții, și formarea unor proteine noi, fapt care duce la creșterea procentajului de aminoacizi (studiați) în timpul germinării.

Tabloul final al conținutului în aminoacizi, privit prin prisma comparației între începutul și sfârșitul stratificării, ne sugerează că diminuarea majorității aminoacizilor din semințele stratificate complet este într-adevăr în legătură cu creșterea activității sistemelor biosintetizatoare necesare dezvoltării atât a embrionului, în general, cât și a componentelor sale structurale apărute în urma germinării, în particular.

Concluzii

În corelație cu informațiile parțiale din literatură, putem concluziona că pe parcursul procesului de stratificare se realizează mobilizarea substanțelor de rezervă (atât a lipidelor cât și a proteinelor), succesiv, în ordinea: ax embrionar și cotiledoane, adică într-o „inversă dependență” cu gradul specializării pentru funcția de depozit.

Rezervele de substanțe sunt imobilizate masiv și relativ stabil la nivelul cotiledoanelor și în mod auxiliar și tranzitoriu la nivelul axului embrionar.

Prin intermediul acestor procese complexe este clarificată problema creșterii procentului unor aminoacizi, concomitent cu scăderea justificată a conținutului celorlalți aminoacizi legați pe parcursul procesului de stratificare.

Bibliografie

1. Altschul A.M., Snowden J.E., Manchon D.D., Dechary J.M., 1961 - Intracellular distribution of proteins. Arch. Biochem, 95,402-404
2. Toma N., Anghel I., 1979 - *Citologie vegetală*, Ed. did. și pedag., București
3. Bewley J.D., Black M., 1978 - *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. I. Development, germination and growth*, Berlin-Heidelberg New York, Springer-Verlag, 306
4. Beynon R.J., 1980 - *The enzymology of posttranslational modification of proteins: Protein modification and the control of intracellular protein degradation*, New York. Acad. Press, 363-385
5. Bierbeck M.S.C., Mercer E.M., 1961 - Cytology of cells which synthesize protein, Nature, 189, 558-560
6. Bogatek R. scolab., 1989 - The embryonic axis controls lipid catabolism in cotyledons of apple seeds during germination, Physiol. Plant., 76 (4), 557-562
7. Creighton T.E., 1984 - *Proteins structures and molecular properties*, Freeman, New York
8. Dascaluc A., Toma O., 1994 - „Stratificarea semian rasteinii: popătka c otenki sostsiania i perspectivă”, Fiziol. Biochem. Kult. Rast. (Kiev), 1, 1-14
9. Dawidowicz-Grzegorzewska A., 1981 - Anatomy, histochemistry and cytology of dormant and stratified apple (*Malus domestica* cultivar Antonovka) embryos: 3. Structural changes during the early development of seedlings in relation to embryonic dormancy, New Phytol., 87 (3), 573-580

10. Ermakov A I Arasimovici V.V. și colab. 1987 - *Metodă biochimică de studiu a rasteii*, Ed. „Agropromizdat”, Leningrad, 234-237, 268-276
11. Ploie G.P., Petre Zoa, 1979 - *Introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară și moleculară*, Ed. Acad. R.S.R., București
12. Schmidt-Ulrich R., Verme S.P., Wallech D.F.H., 1975 - Deamidation of membrane proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67, 1062-1064
13. Tahtadjean A.L., 1991 - „Srvnirea anatomia semuan”, t. III. Izd. „Nauka”, Leningrad
14. Toma O., Dascaluc A., 1993 - Comportamentul fiziologic și biochimic al semințelor stratificate de măr în funcție de genotip, *Lucrări științifice - secția Agronomie*, Ed. Univ. de Șt. Agric., Timișoara, XXVII, 521-524

TABELUL I

Conținutul aminoacizilor în proteinele solubile totale din axul embrionar, cotiledoane și tigelă, pe parcursul stratificării și la începutul germinării

Aminoacid	% (din probele uscate naturale)					
	ax embrionar		cotiledoane		cotiledoane	tigelă
	stratificare				germinare	
	K	STR4	K	STR4		
Acid aspartic	2,02	1,93	2,98	2,39	2,65	0,77
Treonina	0,65	0,68	0,79	0,93	0,54	0,28
Serina	0,68	0,61	0,75	0,85	0,96	0,31
Acidul glutamic	3,89	3,69	6,17	5,46	7,39	1,06
Prolina	1,36	1,19	2,14	1,98	2,45	0,14
Glicina	1,53	1,38	2,97	2,65	1,72	0,38
Anilina	0,94	1,16	1,70	1,52	1,04	0,26
Valina	0,76	0,74	1,46	1,31	0,82	0,41
Metionina	0,29	0,25	0,37	0,32	0,29	0,14
Izoleucina	0,70	0,76	1,35	1,26	0,67	0,34
Leucina	1,48	1,18	3,16	3,03	2,68	0,86
Tirozina	0,36	0,34	0,99	0,86	0,34	0,34
Fenilalanina	0,72	0,70	1,49	1,28	1,13	0,41
Histidina	0,56	0,47	1,40	1,22	0,56	0,36
Lizina	0,74	0,88	0,96	1,02	0,48	0,42
Arginina	1,56	1,68	3,82	2,54	3,15	0,46
Nt	3,36	3,26	5,44	4,86	4,48	1,27
Proteine (Nt*6,25)	21,00	20,38	34,00	30,38	28,00	7,94

O. Toma et al.

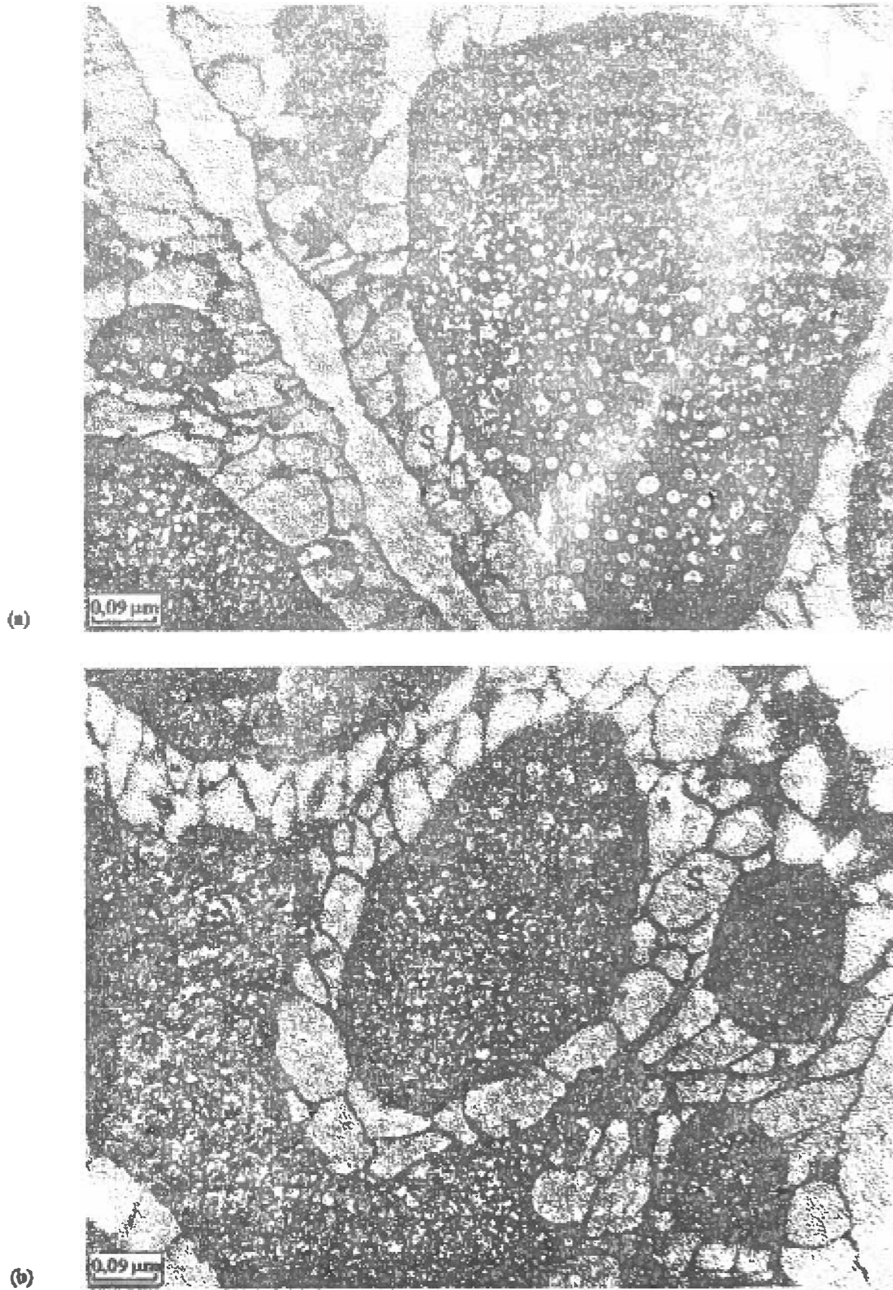


Fig. 1 -- Aspecte de ultrastructură din porțiunea mediană a axului embrionar a unei șelci de la soiul *Slava pobeditelam* - la începutul intervalului de strălucire / (a) și (b) /

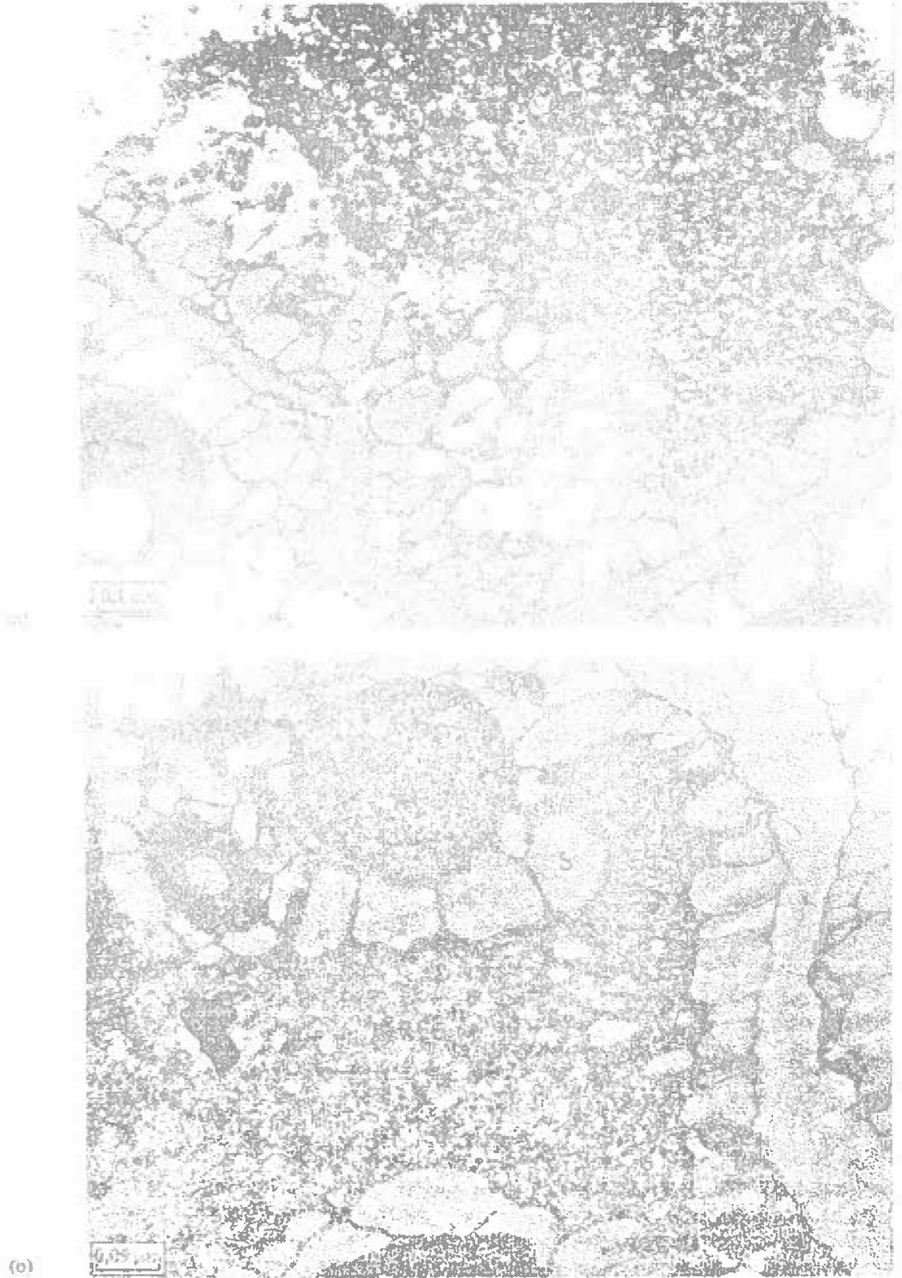


Fig. 2 - Aspecte de ultrastructură din porțiunea mediană a axului embrionar a semințelor de la soiul *Slava pobeditelian* - la sfârșitul intervalului de stratificare / (a) și (b) /