

UNIVERSITATEA DIN PITEȘTI

**MODIFICĂRI HISTOLOGICE, FIZIOLOGICE
ȘI BIOCHIMICE INDUSE DE METALELE GRELE
ASUPRA GAMETOFITULUI ȘI SPOROFITULUI UNOR
SPECII DE FERIGI NATIVE**

- REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT -

Conducător științific:

Prof. univ. dr. Alexandru Gabriel MARINESCU

Doctorand:

Oana - Alexandra DRĂGHICEANU

PITEȘTI
2018

CUPRINS

INTRODUCERE

1 POLUAREA MEDIULUI CU METALE GRELE

- 1.1 GENERALITĂȚI
- 1.2 EMISIILE DE PLUMB, CADMIU ȘI NICHEL ÎN UNIUNEA EUROPEANĂ

2 IMPACTUL CONTAMINĂRII CU METALE GRELE ASUPRA PRINCIPALELOR COMPONENTE ALE ECOSISTEMELOR

- 2.1 POLUAREA ATMOSFEREI
- 2.2 POLUAREA APEI
- 2.3 POLUAREA SOLULUI
 - 2.3.1. Plumbul în sol
 - 2.3.2. Cadmiul în sol
 - 2.3.3. Nichelul în sol

3 MODIFICĂRI INDUSE PLANTELOR DE METALELE GRELE

- 3.1 MODIFICĂRI MORFOLOGICE ȘI HISTOLOGICE
- 3.2 MODIFICĂRI FIZIOLOGICE
 - 3.2.1. Nutriția minerală
 - 3.2.2. Echilibrul hidric
 - 3.2.3. Fotosinteza
 - 3.2.4. Conținutul de clorofilă
 - 3.2.5. Creșterea plantelor
- 3.3 MODIFICĂRI BIOCHIMICE
 - 3.3.1. Activitatea enzimatică
 - 3.3.2. Antioxidanții non enzimatici

4 APLICAȚII ALE PTERIDOFITELOR ÎN TESTELE DE TOXICITATE ȘI ÎN FITOREMEDIERE

- 4.1 UTILIZAREA PTERIDOFITELOR ÎN TESTELE DE TOXICITATE
- 4.2 APLICAȚII ALE PTERIDOFITELOR ÎN FITOREMEDIERE

5 MATERIALE ȘI METODE

- 5.1 DETERMINAREA INFLUENȚEI METALELOR GRELE ASUPRA GAMETOFITULUI
 - 5.1.1 Experimentul G1
 - 5.1.2 Experimentul G2
 - 5.1.3 Experimentul G3
- 5.2 DETERMINAREA INFLUENȚEI METALELOR GRELE ASUPRA SPOROFITULUI MATUR
 - 5.2.1 Experimentul S1
 - 5.2.2 Experimentul S2
 - 5.2.3 Experimentul S3
- 5.3 DESCRIEREA METODELOR APLICATE
 - 5.3.1 Determinarea pH-ului solului
 - 5.3.2 Determinarea rezidului uscat și a conținutului de apă din soluri
 - 5.3.3 Determinarea pierderilor la calcinare a substanței uscate
 - 5.3.4 Determinarea modificărilor histologice

- 5.3.5 Determinarea fotosintezei și respirației
- 5.3.6 Determinarea formelor de apă din frunze
- 5.3.7 Determinarea cantitativă a pigmentilor asimilatori
- 5.3.8 Determinarea activității enzimatică
- 5.3.9 Determinarea conținutului de polifenoli
- 5.3.10 Determinarea cantității de prolină
- 5.3.11 Analiza compoziției chimice a frunzelor
- 5.3.12 Determinarea concentrației de metale grele din sol și plante

REZULTATE OBTINUTE ȘI DISCUȚII

6 EXPERIMENTELE REALIZATE PE GAMETOFITUL ȘI SPOROFITUL TÂNĂR

- 6.1 EXPERIMENT G1
 - 6.1.1 Germinarea sporilor
 - 6.1.2 Diferențierea gametofitului sub influența Cd și Ni
- 6.2 EXPERIMENT G2
 - 6.2.1 Diferențierea gametofitului sub influența Cd
 - 6.2.2 Diferențierea gametofitului sub influența Pb
 - 6.2.3 Diferențierea gametofitului sub influența Ni
- 6.3 EXPERIMENT G3
 - 6.3.1 Diferențierea gametofitului și a sporofitului sub influența metalelor grele
 - 6.3.2 Influența metalelor grele (Pb, Cd, Ni) asupra pigmentilor asimilatori
 - 6.3.3 Influența metalelor grele (Pb, Cd, Ni) asupra conținutului de polifenoli

7 EXPERIMENTELE REALIZATE PE SPOROFITUL MATUR

- 7.1 EXPERIMENT S1
 - 7.1.1 Influența Pb asupra cantității de pigmenți asimilatori
 - 7.1.2 Influența Pb asupra intensității fotosintezei
 - 7.1.3 Influența Pb asupra intensității respirației
 - 7.1.4 Influența Pb asupra activității catalazei
- 7.2 EXPERIMENT S2
 - 7.2.1 Influența Pb asupra cantității de pigmenți asimilatori
 - 7.2.2 Influența Ni asupra cantității de pigmenți asimilatori
 - 7.2.3 Influența Pb și Ni asupra activității catalazei
- 7.3 EXPERIMENT S3
 - 7.3.1 Determinarea caracteristicilor solului
 - 7.3.2 Influența metalelor grele asupra caracteristicilor histologice ale frunzei
 - 7.3.3 Influența metalelor grele asupra caracteristicilor fiziologice ale frunzelor
 - 7.3.4 Influența metalelor grele asupra caracteristicilor biochimice ale frunzei
 - 7.3.5 Determinarea metalelor din frunzele plantelor

8 CONCLUZII

Concluzii referitoare la influența metalelor grele asupra gametofitului ferigilor
Concluzii referitoare la influența metalelor grele asupra sporofitului ferigilor

BIBLIOGRAFIE

INTRODUCERE

Poluarea cu metale grele reprezintă una dintre problemele de actualitate ale omenirii, metalele grele caracterizându-se prin persistență în mediu, nefiind biodegradabile. Cercetările realizate în acest domeniu au în vedere, pe lângă influența metalelor grele asupra viețuitoarelor și posibilitatea de a fi acumulate și transmise de-a lungul lanțului trofic. Asupra diferitelor grupe de organisme, metalele grele generează o cascadă de răspunsuri la nivel anatomic, morfologic, fiziologic și biochimic etc., răspunsuri care pot fi utile în evaluarea riscului de mediu.

Cercetările relativ recente au prezentat importanța pteridofitelor atât ca grup relevant pentru testele de toxicitate acută și cronică, cât și ca sisteme experimentale facile din punct de vedere al materialului biologic inițial, al metodelor de cultivare, al modului de conservare în laborator etc. (Catalá și colab., 2011).

Răspândirea biogeografică extinsă și habitatele unice în care pteridofitele sunt întâlnite au oferit acestora posibilitatea să realizeze adaptări noi la acțiunea factorilor de stres; acestea constituie modele excelente pentru cercetare, astfel că au fost elaborate metode rapide și eficiente prin care se testează fitotoxicitatea la nivelul sporilor și a gametofitului, metode care mențin relevanța biologică a testelor pe plantele întregi (Catalá și colab., 2011).

În România, cercetările în domeniul pteridologiei au vizat în principal aspecte referitoare la: morfo-anatomie (Bercu, 1999; Dorin, 2000), embriogeneză (Soare, 2011a), conservare *ex situ* și *in situ* (Banciu și colab., 2009; Soare, 2011b; Aldea și colab., 2013), activitate biologică a extractelor obținute din pteridofite (Soare și colab., 2012; Soare și Șuțan, 2018), influența unor pesticide asupra diferențierii gametofitului, la care se adaugă numeroasele cercetări floristice și fitocenologice care includ și reprezentanți ai acestui grup de plante.

În ceea ce privește cercetările în domeniul influenței metalelor grele asupra gametofitului și a sporofitului pteridofitelor, la nivel național, acestea sunt limitate la rezultatele prezentate în două lucrări de specialitate care prezintă influența plumbului asupra germinației sporilor și a diferențierii gametofitului la speciile *Athyrium filix-femina*, *Dryopteris affinis* și *D. carthusiana* (Soare și colab., 2014), precum și capacitatea de bioacumulare *in vitro* a Pb (Soare și colab., 2015). Astfel, Soare și colab. (2014) au evidențiat o serie de modificări în ceea ce privește procesul de germinație și diferențierea gametofitului speciilor menționate, modificări printre care se numără: întârzierea procesului de diferențiere, necrozarea gametofitului, inhibarea formării sporofitului, modificări dependente de concentrația de plumb la materialul biologic a fost expus.

Modificările induse de metalele grele la nivel morfologic, anatomic, fiziologic, biochimic etc. sunt considerate biomarkeri utili în evaluarea stării de poluare a mediului (Gostin, 2007; Ayeni și colab., 2010), astfel că utilizarea ferigilor ca sisteme biologice experimentale uni - sau

pluricelulare într-o astfel de cercetare va extinde paleta speciilor care pot fi utilizate în ecotoxicologie.

Cercetarea de față evidențiază o serie de aspecte complexe ale influenței metalelor grele asupra ferigilor, în ambele faze ale ciclului de viață: spor și gametofit, precum și sporofit matur.

Lucrarea este structurată în 7 capitole. În primele două capitole sunt prezentate informații generale despre metalele grele și poluarea produsă de acestea (la nivelul aerului, apei și solului). Modificările induse de metalele grele asupra plantelor la nivel histologic, fiziologic și biochimic sunt descrise în capitolul 3, iar în capitolul 4 se evidențiază stadiul actual al cercetărilor realizate pe ferigi și metale grele. În capitolul 5 este descris modul de lucru abordat pentru gametofit și sporofit. Capitolele 6 și 7 prezintă rezultatele obținute în urma experimentelor efectuate la nivelul gametofitului (G1, G2, G3) și sporofitului (S1, S2, S3) și discuțiile care se impun pe baza acestora. După rezultatele și discuțiile susținute de bogata bibliografie sunt trase concluzii pertinente.

Scopul acestei teze a fost de acela de a determina modificările histologice, fiziologice și biochimice induse de metalele grele asupra gametofitului și sporofitului unor specii de ferigi native, modificări utile în evaluarea mediului poluat. În vederea îndeplinirii acestui scop s-au stabilit următoarele obiective specifice:

- **la nivelul gametofitului s-a urmărit determinarea influenței metalelor grele asupra:**
 - procentului germinativ al sporilor,
 - diferențierii gametofitului la speciile de ferigi luate în studiu,
 - evaluării comparative a procesului de diferențiere (din punct de vedere al metalului, speciei, mediului de cultură),
 - conținutului de pigmenți asimilatori și polifenoli la materialul vegetal obținut (gametofit și sporofit tânăr);

- **la nivelul sporofitului, s-au urmărit modificările induse de metalele grele:**
 - la nivel histologic,
 - asupra proceselor fiziologice (fotosinteză și cantitate de pigmenți asimilatori, respirație și echilibrului hidric),
 - la nivel biochimic: activitatea enzimelor, conținutul de prolină și polifenoli.

Pentru realizarea cercetărilor au fost selectate specii de ferigi leptosporangiate care sunt întâlnite atât în flora României, cât și în cea europeană, astfel încât rezultatele să fie relevante nu numai la nivel național.

5 MATERIALE ȘI METODE

Determinarea influenței metalelor grele asupra gametofitului

Pentru îndeplinirea obiectivelor stabilite pentru gametofit, s-au realizat în timp (perioada: 2014-2016), mai multe experimente care diferă din punct de vedere al metalelor și concentrațiilor folosite, al speciilor utilizate și al mediului de cultură.

Pentru cele trei experimente, materialul biologic a fost colectat de la exemplare aflate în Valea Vâlsanului (Județul Argeș, România). Frunzele mature ale ferigilor au fost colectate de la indivizi din situri diferite pentru a asigura diversitatea genetică, apoi învelite în hârtie și transportate în pungi de plastic.

În laborator, frunzele au fost menținute la temperatura camerei cu partea inferioară pe hârtie, pentru a elibera sporii din sporangi. După eliberare, a urmat colectarea și păstrarea lor în frigider la 4°C, pentru o perioadă scurtă de timp, până în momentul utilizării.

Vasele în care au fost realizate culturile au fost păstrate într-o cameră de creștere POL EKO 350. Valorile temperaturii au fost de 25°C în timpul zilei și 15°C noaptea, iar condițiile de umiditate și iluminare au fost și ele controlate (fotoperioda: 16 ore de lumină și 8 ore de întuneric).

După o săptămână de la inițierea studiului s-a determinat procentul de spori germinați. Se consideră că sporii au germinat dacă celula rizoidală poate fi identificată microscopic. Au fost efectuate trei repetiții pentru fiecare variantă, din care sporii au fost selectați aleatoriu pentru a determina procentul de germinare. Interpretarea statistică a fost efectuată utilizând SPSS (versiunea 16 pentru Windows). S-au calculat valoarea medie, deviația standard și / sau coeficientul de corelație simplă Pearson (r). De asemenea, s-a calculat semnificația diferenței dintre medii cu ajutorul testului de comparații multiple Duncan. Diferențierea gametofitului a fost monitorizată periodic. Materialul biologic a fost microfotografiat la microscopul B275 OPTIKA cu cameră foto A630 Canon Power Shoot și/sau la stereo-microscop OPTIKA.

Experimentul G1

Materialul biologic a fost reprezentat de spori de la exemplarele de *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott și *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenk.

Variantele experimentale testate au fost: M (martor) - soluție Knop [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$:1,00 g·L⁻¹; MgSO_4 :0,25 g·L⁻¹; KH_2PO_4 :0,25g·L⁻¹; KNO_3 :0,25g·L⁻¹]; V₁Cd - 0,001 g Cd²⁺ L⁻¹ soluție Knop; V₂Cd - 0,006 g Cd²⁺ L⁻¹ soluție Knop; V₃Cd - 0,01 g Cd²⁺ L⁻¹ soluție Knop; V₁Ni - 0,01 g Ni²⁺ L⁻¹ soluție Knop; V₂Ni - 0,07 g Ni²⁺ L⁻¹ soluție Knop; V₃Ni - 0,1 g Ni²⁺ L⁻¹ soluție Knop.

Determinările realizate: procentul germinativ, diferențierea gametofitului.

Experimentul G2

Materialul biologic utilizat a fost reprezentat de spori colectați de la speciile de pteridofite: *Asplenium scolopendrium* L., *Athyrium filix-femina* (L.) Roth., *Dryopteris filix-mas*(L.) Schott.

Mediile de testare au fost diferite, respectiv:

- soluție Knop,
- pământ "Florisol" obținut prin procesare din depozitul din Dersca-Dorohoi, cu pH între 6,5-7, umiditate 60-70%, N: 410 ppm, P: 192 ppm, K: 1350 ppm; substanță organică minim 70% produs uscat.

Substanțele testate au fost acetatul de Cd și Pb și sulfatul de Ni, în diferite concentrații; raportarea a fost făcută per L pentru probele din soluția Knop și pe kg pentru variantele pe sol:

- Martor (M) = 0 g Cd²⁺; Pb²⁺; Ni²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹;
- V₁Cd = 0,025 g Cd²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹; V₂Cd = 0,05 g Cd²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹; V₃Cd = 0,1 g Cd²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹; V₄Cd = 0,15 g Cd²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹;
- V₁Pb = 0,25 g Pb²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹; V₂Pb = 0,5g Pb²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹; V₃Pb = 1g Pb²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹; V₄Pb = 1,5g Pb²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹;
- V₁Ni = 0,25g Ni²⁺L⁻¹ / kg⁻¹; V₂Ni =0,5g Ni²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹; V₃Pb = 1g Ni²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹; V₄Ni = 1,5g Ni²⁺ L⁻¹ / kg⁻¹.

Determinările realizate: procentul germinativ, diferențierea gametofitului.

Experimentul G3

Materialul biologic inițial a fost reprezentat de sporii proveniți de la *Athyrium filix-femina*, *Dryopteris filix-mas* și *Dryopteris affinis*.

Solul utilizat a fost prelevat din pădure, sterilizat la 105°C la etuvă timp de 2 ore și jumătate; au fost determinate: pH-ul (6,99 -7,97), substanța organică (20-30%), umiditatea (40-50%).

Pentru fiecare variantă s-a utilizat sol (kg⁻¹) care a fost tratat cu soluție Knop, în care a fost dizolvat acetatul de Cd, respectiv acetatul de Pb și sulfatul de Ni aflate în diferite cantități pentru obținerea unor concentrații progresive:

- V₁Cd = 0,01g Cd²⁺kg⁻¹; V₂Cd = 0,02 g Cd²⁺kg⁻¹; V₃Cd = 0,05 g Cd²⁺kg⁻¹; V₄Cd = 0,1 g Cd²⁺kg⁻¹;
- V₁Pb = 0,1g Pb²⁺kg⁻¹; V₂Pb = 0,2 g Pb²⁺kg⁻¹; V₃Pb = 0,5g Pb²⁺ kg⁻¹; V₄Pb =1g Pb²⁺kg⁻¹;
- V₁Ni = 0,1g Ni²⁺kg⁻¹; V₂Ni = 0,2g Ni²⁺kg⁻¹; V₃Ni = 0,5g Ni²⁺kg⁻¹; V₄Ni =1g Ni²⁺kg⁻¹.

După omogenizare solul a fost pus în cutii Petri (50 mg/cutie) și distribuit uniform; raportarea a fost făcută pe kg. Sporii au fost dispersați uniform pe toată suprafața solului din cutie. După 4 luni de la inițierea experimentului, materialul biologic obținut a fost utilizat pentru determinarea conținutului de pigmenți și polifenoli.

Determinările realizate: procentul germinativ, diferențierea gametofitului, cantitatea de pigmenți asimilatori, conținutul de polifenoli.

Determinarea influenței metalelor grele asupra sporofitului matur

În ceea ce privește îndeplinirea obiectivelor stabilite pentru sporofitul matur au fost realizate trei experimente (S1, S2, S3). De-a lungul perioadei de studiu (2014-2016) au fost testate mai multe metale aflate în diferite concentrații; au fost utilizate mai multe specii de ferigi și două tipuri de substrat: pământ de flori "Florisol" și sol din pădure (S2 și S3). Ca și în cazul gametofitului, materialul biologic utilizat în cadrul celor trei experimente a fost colectat din Valea Vâlsanului, iar interpretarea statistică a fost efectuată utilizând SPSS (versiunea 16 pentru Windows). Pentru a exclude influența plantelor utilizate asupra rezultatelor, au fost utilizate plante mature care aveau dimensiuni similare ale frunzelor și rizomilor, respectiv plante cu sporangi pe frunze și un set de frunze moarte din anul precedent. Determinările au fost realizate la nivelul frunzelor. S-au calculat valoarea medie, deviația standard și semnificația diferenței dintre medii cu ajutorul testului de comparații multiple Duncan (literele diferite arată că între medii există diferențe semnificative, pentru pragul de semnificație $p < 0,05$).

Experimentul S1

Material biologic utilizat a fost reprezentat de indivizi maturi de *Asplenium scolopendrium* L.

După aclimatizare, care a durat 2 luni, plantele au fost transferate în ghivecele cu sol pregătit pentru experiment. Solul folosit a fost tip Florisol (S.C. Florisol Product S.R.L.) obținut prin prelucrarea materialului din depozitul Dersca-Dorohoi, având următoarele caracteristici fizico-chimice: substanță organică în produs uscat - minimum 70%; pH 6,5-7,0; umiditate 60-70%; N: 410 ppm, P: 192 ppm, K: 1350 ppm. Substanța folosită pentru a încorpora Pb în sol a fost $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

Variantele experimentale au fost: Martor (M) = $0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ sol; $V_1 = 0,2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ sol; $V_2 = 0,75 \text{ g} \cdot \text{sol kg}^{-1}$; $V_3 = 1 \text{ g} \cdot \text{sol kg}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ și s-au obținut concentrațiile: $V_1 = 0,07625 \text{ g kg}^{-1} \text{Pb}^{+2}$; $V_2 = 0,33220 \text{ g kg}^{-1} \text{Pb}^{+2}$; $V_3 = 0,60868 \text{ g kg}^{-1} \text{Pb}^{+2}$.

Determinările realizate: cantitatea de pigmenți asimilatori, intensitatea fotosintezei și respirației, activitatea catalazei.

Experimentul S2

Materialul biologic utilizat a constat în exemplare mature de *Asplenium scolopendrium* L., *Athyrium filix-femina* (L.) Roth, *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. După aclimatizare, plantele au fost transplantate în ghivece cu sol în care s-a adăugat $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ și NiSO_4 în diferite concentrații, obținându-se următoarele variante experimentale: 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5 g $\text{Pb}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ kg^{-1} sol. Pe parcursul a trei luni, plantele au fost menținute în condiții de seră fiind udate periodic cu 200 ml apă distilată. La intervale regulate ghivecele au fost mutate pentru a asigura condiții uniforme, pentru fiecare concentrație utilizându-se 3 exemplare cu 4 -5 frunze mature.

Determinările realizate: cantitatea de pigmenți asimilatori, activitatea catalazei.

Experimentul S3

Materialul biologic utilizat a fost reprezentat de indivizi maturi de *Asplenium scolopendrium* L. După aclimatizare plantele au fost transplantate în ghivece cu diferite concentrații de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ și NiSO_4 (0; 0,25; 0,5; 1; 1,5 g $\text{Pb}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ kg^{-1} sol) și $\text{Cd}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15 g Cd^{2+} kg^{-1} sol). La intervale regulate de timp ghivecele au fost mutate pentru a asigura condiții uniforme. După o perioadă de 4 luni, timp în care plantele au fost menținute în solul amestecat cu metale grele și udate periodic cu apă distilată, s-au efectuat determinările.

Determinările realizate: pH-ul, umiditatea și cantitatea de substanță organică din sol, modificările histologice și formele de apă de la nivelul frunzelor, cantitatea de pigmenți asimilatori, activitatea enzimatică, profilul izoenzimelor, conținutul de polifenoli și prolină, compoziția chimică a frunzelor, cantitatea de metale grele din frunze.

REZULTATE OBȚINUTE ȘI DISCUȚII

6 EXPERIMENTELE REALIZATE PE GAMETOFITUL ȘI SPOROFITUL TÂNĂR

6.1 Experiment G1

6.1.1 Germinarea sporilor

Conform datelor obținute, după o săptămână de la inițierea experimentului, germinarea sporilor a fost influențată de prezența compușilor cu metale grele în mediul de cultură. Au existat diferențe semnificative între procentul de spori germinați la martor și cel determinat la celelalte variante experimentale (Tab. 6.1). La speciile *Dryopteris affinis* și *Dryopteris filix-mas* cel mai mic procent de germinație (6% respectiv 15%), în cazul expunerii la Cd, s-a înregistrat pentru

cea mai mare concentrație de Cd utilizată. În cazul expunerii la Ni, cea mai scăzută valoare a procentului de germinație pentru *Dryopteris affinis* s-a înregistrat la varianta V₃ (19%), iar pentru *Dryopteris filix-mas* la varianta V₂ (15%). Prin aplicarea testului Duncan de comparații multiple s-a constatat că între varianta martor și varianta cu cea mai mică concentrație de Cd testată nu există diferențe semnificative ($p < 0,05$) ale procentului de germinație a sporilor de *Dryopteris affinis*. Pentru specia *Dryopteris filix-mas*, între variantele V₁Cd și V₂Cd nu s-au evidențiat diferențe semnificative ($p > 0,05$). De asemenea, în cazul influențării cu Ni, creșterea concentrației peste valoarea din V₂Ni nu a mai produs modificări semnificative ale procentului de germinație ($p < 0,05$). Pentru toate celelalte variante, diferențele dintre mediile procentului de germinație au fost semnificative ($p < 0,05$). La ambele specii, coeficientul de corelație Pearson a arătat o corelație negativă între procentul de spori germinați și concentrația de metale grele în mediul de cultură.

În literatura de specialitate se menționează faptul că gametofitul este etapa cea mai sensibilă din ciclul de viață al pteridofitelor (Gupta și colab., 1992), deoarece numeroși factori exogeni pot influența germinarea sporilor. Printre aceștia se numără poluanți precum pesticidele (Keary și colab., 2000; Sheffield, 2002; Luo și Ikeda 2007; Cassanego și colab., 2010; Droste și colab., 2010), metalele (Nishizono și colab., 1987; Gupta și Devi, 1992; Gupta și colab., 1992; Ma și colab., 2001; Kamachi și colab., 2005; Muccifora, 2008; Kieling-Rubio și colab., 2012; Soare și colab., 2013b). Din cercetări anterioare, se cunoaște faptul că germinarea sporilor la *Regnellidium diphyllum* a fost afectată de concentrații de 0,05 până la 100 mg Ni L⁻¹ (Kieling-Rubio și colab., 2012). Germinarea sporilor de *Ceratopteris thalictroides*, *Drynaria quercifolia*, *Cristella parasitica*, *Pteris ensiformis*, *Amelopters proliifera* și *Adiantum lunulatum* a fost afectată de diferite concentrații de cadmiu (Gupta și Devi, 1992).

Acetatul de plumb (10 mg / 100 ml, respectiv 50 mg / 100 ml soluție Knop) a afectat germinarea sporilor și diferențierea gametofitului la speciile *Athyrium filix-femina*, *Dryopteris affinis* și *D. carthusiana* (Soare și colab., 2014).

Tab. 6.1. Influența metalelor grele asupra germinației sporilor (%)

Specie	Variante						
	Martor	V ₁ Cd (0,001g Cd ²⁺)	V ₂ Cd (0,006 g Cd ²⁺)	V ₃ Cd (0,01 g Cd ²⁺)	V ₁ Ni (0,01 g Ni ²⁺)	V ₂ Ni (0,07 g Ni ²⁺)	V ₃ Ni (0,1 g Ni ²⁺)
<i>Dryopteris affinis</i>	82±3,6 ^a	71±3 ^a	59±10,5 ^b	6±2,6 ^c	66,6±2,5 ^b	45±5,1 ^c	19±6,5 ^d
<i>Dryopteris filix-mas</i>	69±1,7 ^a	55,6±4,7 ^b	48,3±5,5 ^b	15,3±3,5 ^c	42,3±9,2 ^b	15±2 ^c	18±10,1 ^c

Legendă: Valorile reprezintă media calculată pentru 3 repetiții; Literale reprezintă interpretarea testului Duncan, analizându-se diferențele dintre varianta martor și variantele influențate cu metal: literale diferite arată că între medii există diferențe semnificative, pentru pragul de semnificație $p < 0,05$.

6.1.2 Diferențierea gametofitului sub influența Cd și Ni

De-a lungul perioadei de monitorizare a diferențierii gametofitului s-au observat diferențe atât între cele două specii, cât și între variantele experimentale ale aceleiași specii. Astfel, la o lună după inițierea experimentului, la ambele specii, martorul a fost în stadiul de lamă protaliană, iar la celelalte variante au fost stadii mai puțin avansate (Tab. 6.2). S-a constatat că a existat o tendință de ramificare a filamentelor protaliene la *Dryopteris affinis* -V₁Cd și V₁Ni. De asemenea, la unele variante, s-a observat tendința gametofitului de a forma mase celulare tridimensionale (*Dryopteris affinis*: V₁Cd, V₂Cd, V₁Ni; *Dryopteris filix-mas*: V₂Cd și V₁Ni), așa cum se poate observa în figura 6.2; fenomen raportat de Soare și colab. (2013a) și la gametofitul speciilor *Athyrium filix-femina* și *Polypodium vulgare* tratat cu bifentrin. La varianta V₃Cd la *Dryopteris affinis* și la variantele V₂Ni și V₃Ni ale ambelor specii s-a observat stadiul de spori germinați. O altă diferență constatată la gametofitul speciei *Dryopteris affinis*, la varianta V₁Ni - rizoizii au fost mai puțini și mai scurți în comparație cu celelalte variante (Fig. 6.1).

După două luni de la începerea experimentului, diferențele între stadiile de dezvoltare ale gametofitului s-au menținut la ambele specii (Tab. 6.3). În ceea ce privește diferențierea gametofitului la *Dryopteris affinis*, la Martor, V₁Cd și V₂Cd s-a observat stadiul de protal cordat, în timp ce la V₁Ni gametofitul era în stadiu de filament și lamă protaliană; celelalte variante aflându-se în stadiul de spori germinați. La *Dryopteris filix-mas*, stadiile de diferențiere au fost: lame protaliene la Martor, V₁Cd, V₂Cd, V₃Cd, filamente pentru V₁Ni și spori germinați pentru V₂Ni și V₃Ni.

Tab. 6.2 Stadiile de diferențiere ale gametofitului după o lună de la inițierea experimentului G1

Variante	Specie	
	<i>Dryopteris affinis</i> (Da)	<i>Dryopteris filix-mas</i> (Dfm)
Martor	formarea lamei și lamă protaliană	lamă protaliană
V₁Cd (0,001 g Cd ²⁺ L ⁻¹)	filamente protaliene, stadiu de formare a lamei, tendință de ramificare și formare de mase celulare tridimensionale	formarea lamei
V₂Cd (0,006 g Cd ²⁺ L ⁻¹)	filamente scurte cu tendință de a forma mase celulare tridimensionale	filamente protaliene cu tendințe de formare a unor mase tridimensionale
V₃Cd (0,01 g Cd ²⁺ L ⁻¹)	foarte puțini spori germinați	formarea filamentelor, unele sunt deteriorate
V₁Ni (0,01 g Ni ²⁺ L ⁻¹)	filamente cu ramificații, cu rizoizi scurți cu tendință de a forma mase celulare tridimensionale	formarea filamentului și tendință de formare a unor mase tridimensionale
V₂Ni (0,07 g Ni ²⁺ L ⁻¹)	spori germinați necrozați	spori germinați necrozați
V₃Ni (0,1 g Ni ²⁺ L ⁻¹)	spori germinați	spori germinați

De asemenea, pigmentii clorofilieni de la *Dryopteris affinis* au fost afectați, la V₁Ni filamentele și lamele protaliene au fost decolorate (Fig. 6.3). Variantele care au avut o concentrație mare de compus metalic (V₂Ni, V₃Ni) au dus la necroza sporilor germinați.

Tab. 6.3 Stadiile de diferențiere ale gametofitului după 2 luni de la inițierea experimentului G1

Variante	Specie	
	<i>Dryopteris affinis (Da)</i>	<i>Dryopteris filix-mas (Dfm)</i>
Martor	lamă protaliană, protal cordat, anteridii	lamă, protal cordat
V₁Cd (0,001 g Cd ²⁺ L ⁻¹)	protal cordat	lamă protaliană și protal cordat tânăr
V₂Cd (0,006 g Cd ²⁺ L ⁻¹)	protal cordat	lamă și protal cordat tânăr
V₃Cd (0,01 g Cd ²⁺ L ⁻¹)	spori necrozați	lamă protaliană, protal cordat și anteridii
V₁Ni (0,01 g Ni ²⁺ L ⁻¹)	filament și lamă decolorate	filament și lamă protaliană necrozate
V₂Ni (0,07 g Ni ²⁺ L ⁻¹)	spori germinați necrozați	spori germinați necrozați
V₃Ni (0,1 g Ni ²⁺ L ⁻¹)	spori germinați necrozați	spori germinați necrozați

Wahid și colab. (2008) au arătat că stresul produs de Cd duce la cloroză, necroză și pierderea pigmentilor în frunzele de la *Vigna radiata*. Cloroza frunzelor a fost raportată de Perveen și colab. (2011) ca simptom de toxicitate a Cd la *Zea mays*. De asemenea, scăderea pigmentilor fotosintetici în frunzele de *Pisum sativum* a fost observată de Singh (2014) ca răspuns la toxicitatea Cd.

La ultima monitorizare a diferențierii gametofitului, care a fost efectuată după patru luni de la expunere (Tab. 6.4), la ambele specii, variantele cu Ni au avut o influență negativă mai puternică asupra gametofitului: lamele și filamentele erau decolorate, iar spori germinați deveniseră necrotici stopând astfel ciclul de diferențiere. O situație similară a fost observată și la V₃Cd la *Dryopteris affinis*. La martor, la cele două specii, s-a observat stadiul protal cordat cu/fără anteridii.

Tab. 6.4 Stadiile de diferențiere ale gametofitului după 4 luni de la inițierea experimentului G1

Variante	Specie	
	<i>Dryopteris affinis (Da)</i>	<i>Dryopteris filix-mas (Dfm)</i>
Martor	lamă protaliană, protale cordate ramificate foarte mult, anteridii	protal cordat
V₁Cd (0,001 g Cd ²⁺ L ⁻¹)	protal cordat cu ramificații	protal cordat parțial necrozat
V₂Cd (0,006 g Cd ²⁺ L ⁻¹)	protal cordat	protal cordat
V₃Cd (0,01 g Cd ²⁺ L ⁻¹)	spori necrozați	lamă protaliană și protal cordat
V₁Ni (0,01 g Ni ²⁺ L ⁻¹)	lame decolorate	filamente și lame decolorate
V₂Ni (0,07 g Ni ²⁺ L ⁻¹)	spori germinați necrozați	spori germinați necrozați
V₃Ni (0,1 g Ni ²⁺ L ⁻¹)	spori germinați necrozați	spori germinați necrozați

După două luni de la începutul experimentului, s-a observat o acumulare de metal pe suprafața gametofitului la unele variante cu Cd (*Dryopteris affinis* V₁Cd - Fig. 6.4, 6.5; *Dryopteris filix-mas* V₃Cd - Fig 6.7, 6.8), iar după patru luni s-a observat precipitarea metalelor

(Fig. 6.6, Fig 6.9). Aceasta din urmă s-a datorat biosorbției pereților celulari sau precipitării compușilor metalici (Gadd, 2010). Considerăm că, în cazul particular al gametofitului pteridofitelor leptosporangiate, depozitul ar putea fi favorizat în mare parte de dimensiunile mici și de structura unistratificată, deoarece aproape toate celulele sunt expuse direct mediului. Precipitarea structurilor cristaline a fost evidențiată în ultimii ani și la alte specii de ferigi: în jurul rizoizilor protalieni de *Athyrium filix-femina* a fost observată la gametofitul tratat cu un fungicid de cupru (Soare și colab., 2013a), precum și la vârful papilelor gametofitului speciei *Asplenium scolopendrium*, tratat cu un fungicid care conține 20% cupru metalic (Soare și colab., 2013c). Această proprietate poate avea o importanță deosebită în bioremedierea mediilor contaminate cu metale.



Fig. 6.1 *Da V1Ni* 1 lună (x100)



Fig. 6.2 *Dfm V1Ni* 1 lună (x100)



Fig. 6.3 *Da V1Ni* 2 luni (x100)

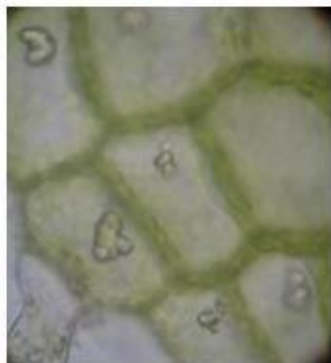


Fig. 6.4 *Da V1Cd* 2 luni (x400)



Fig. 6.5 *Da V1Cd* 2 luni (x100)

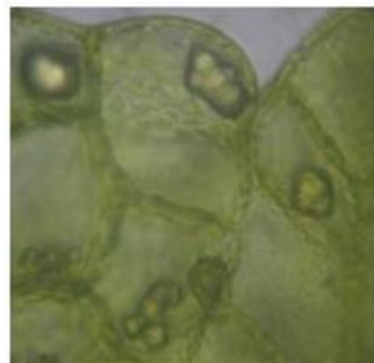


Fig. 6.6 *Da V1Cd* 4 luni (x400)



Fig. 6.7 *Dfm V3Cd* 2 luni (x100)



Fig. 6.8 *Dfm V3Cd* 2 luni (x400)



Fig. 6.9 *Dfm V3Cd* 4 luni (x100)

7 EXPERIMENTELE REALIZATE PE SPOROFITUL MATUR

7.1 Experiment S1

7.1.1 Influența Pb asupra cantității de pigmenți asimilatori

După 1 lună de expunere, pentru clorofila *a* a fost înregistrată o singură diferență semnificativă între variantele cu Pb V₁ (1,136 mg g⁻¹s.p.) și V₃ (1,054 mg g⁻¹s.p.). În cazul clorofilei *b* valorile obținute s-au încadrat în intervalul 0,688-0,708 mg g⁻¹s.p., iar pentru carotenoizi 0,334-0,377 mg g⁻¹s.p. La variantele cu Pb s-a observat o tendință ascendentă a cantității de carotenoizi maximul fiind atins la V₃ (0,377 mg g⁻¹s.p.) (Fig. 7.1).

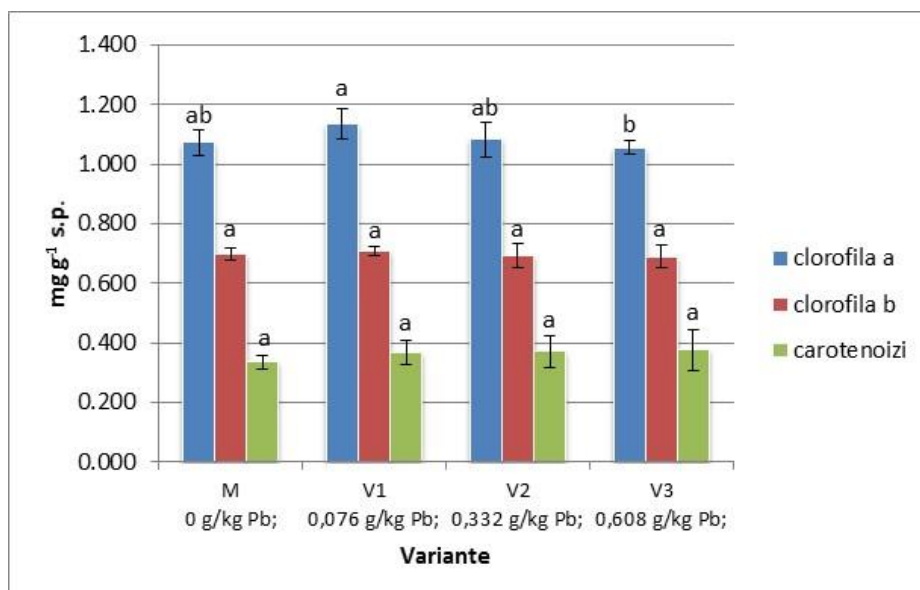


Fig. 7.1 Cantitatea de pigmenți asimilatori la *A. scolopendrium* după 1 lună de expunere la Pb

În cea de-a doua lună de expunere, s-a menținut tendința de creștere a cantității de clorofilă *a* la variantele cu concentrații mici de Pb (V₁₋₂), cea mai mare creștere fiind cu 7%, în timp ce la V₃ s-a determinat o reducere cu 3%, comparativ cu martorul. Diferențe semnificative au fost evidențiate numai între variantele V₁ (1,12 mg g⁻¹ s.p.) și V₃ (1,024 mg g⁻¹ s.p.). O situație similară a fost înregistrată și în cazul clorofilei *b*, cantitatea de pigmenți crescând la variantele cu concentrații mici și scăzând la variantele cu concentrații mari. La clorofila *b* creșterile și descreșterile au avut o amplitudine mai mică, astfel încât diferențele dintre variante nu au fost semnificative. Cantitatea de carotenoizi a înregistrat creșteri cu 3% și 5% la variantele V₂ și V₃ comparativ cu martorul (0,328 mg g⁻¹ s.p.) (Fig. 7.2).

După trei luni de expunere la Pb, la V₁, creșterea concentrației de clorofilă *a* a fost cu 6%, comparativ cu martorul. La varianta V₃ cantitatea de clorofilă *a* a fost de 0,984 mg g⁻¹ s.p., ceea ce înseamnă o reducere cu aproximativ 7% comparativ cu martorul, situație existentă atât pentru clorofila *a* cât și pentru clorofila *b* la V₃.

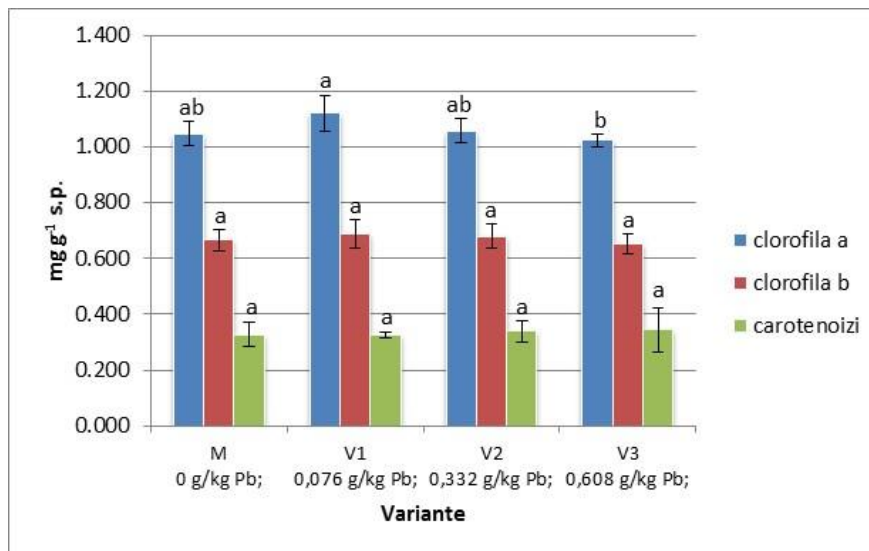


Fig. 7.2 Cantitatea de pigmenți asimilatori la *A. scolopendrium* după 2 luni de expunere la Pb

La variantele cu concentrații mici de Pb (V₁₋₂) s-a obținut cea mai mare concentrație de clorofilă *b* (0,709 mg g⁻¹ s.p.). Cantitatea de pigmenți carotenoizi a variat între 0,353 - 0,381 mg g⁻¹ s.p., cu cea mai mare concentrație determinată pentru varianta V₃ (Fig. 7.3).

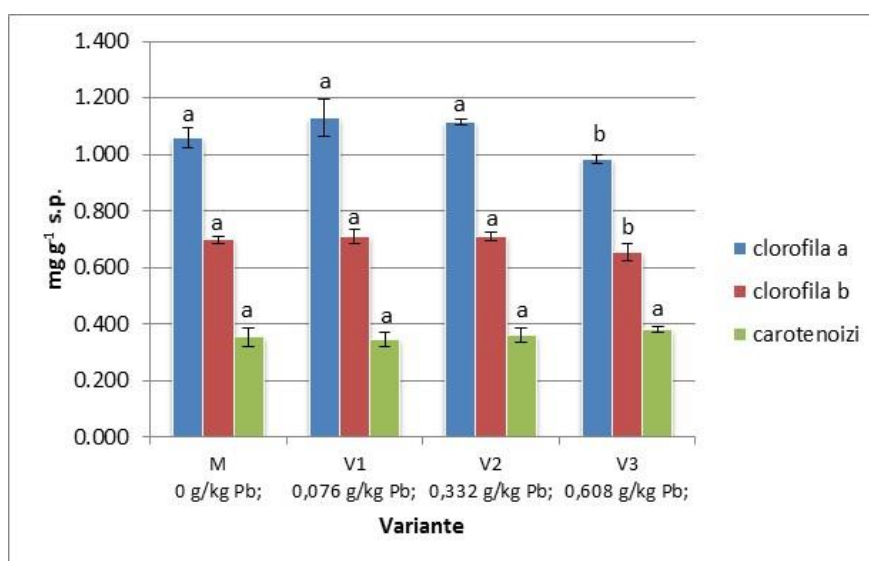


Fig. 7.3 Cantitatea de pigmenți asimilatori la *A. scolopendrium* după 3 luni de expunere la Pb

După 4 luni de expunere, cantitatea de clorofila *a* a variat între 1,05 mg g⁻¹ s.p. (V₂) și 1,17 mg g⁻¹ s.p. (V₁), cu o valoare de 1,08 mg g⁻¹ s.p. la martor. Cantitatea de clorofila *b* a fost cuprinsă între 0,621 mg g⁻¹ s.p. (V₃) și 0,687 mg g⁻¹ s.p. (V₁), martorul având o cantitate de 0,69 mg g⁻¹ s.p. (Fig. 7.4). În ceea ce privește cantitatea de carotenoizi, la varianta cu cea mai mică concentrație de Pb în sol (V₁) creșterea a fost mult mai pronunțată față de martor (cu 36%). Creșterea concentrației carotenoizilor reduce stresul determinat de Pb, acești pigmenți având rol antioxidant (Michalak, 2006; Patra și colab., 2011; Shu și colab., 2012).

Pigmenții asimilatori constituie indicatori ce pot fi luați în calcul pentru a determina

toxicitatea Pb asupra plantelor superioare (Krupa și colab., 1996). Cercetările menționează situații în care Pb nu influențează semnificativ concentrația de clorofilă (Olivares, 2003; Rossato și colab., 2012), situație întâlnită în cazul de față la variantele cu concentrații mari de Pb în sol (Fig. 7.4). La cea mai mică concentrație, V₁, s-a observat o ușoară creștere a cantității de clorofilă *a*, respectiv *b*. Același efect a fost semnalat și de Kaznina și colab. (2005), Shu și colab. (2012), Wiszniewska și colab. (2015). Cantitatea de clorofilă *a* și *b* nu a fost influențată semnificativ de tratamentul cu Pb la variantele V₂ și V₃, comparativ cu martorul.

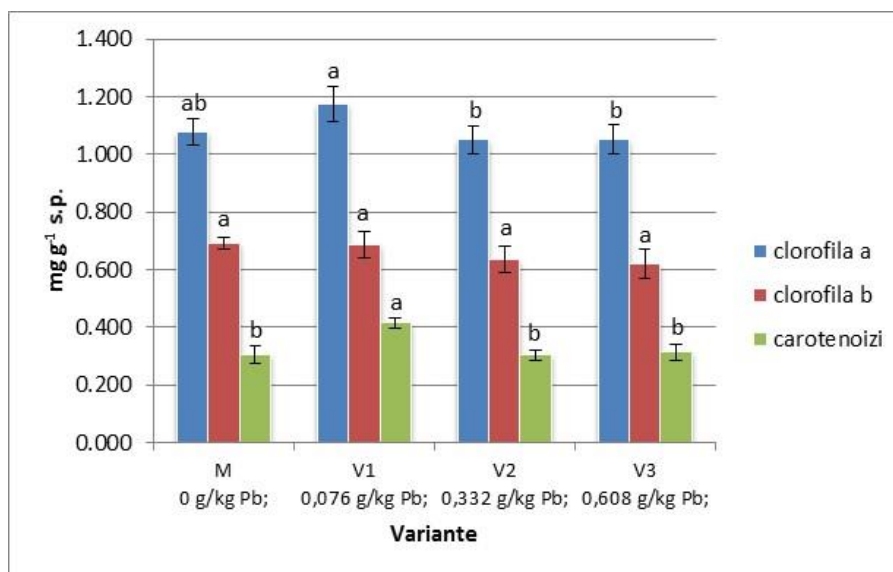


Fig. 7.4 Cantitatea de pigmenți asimilatori la *A. scolopendrium* după 4 luni de expunere la Pb

După cinci luni de expunere diferențele dintre variante s-au redus treptat, valorile obținute pentru clorofila *a* încadrându-se în intervalul 1,049-1,116 mg g⁻¹ s.p., pentru clorofila *b* între 0,680- 0,696 mg g⁻¹ s.p., iar pentru carotenoizi între 0,307-0,344 mg g⁻¹s.p. (Fig.7.5).

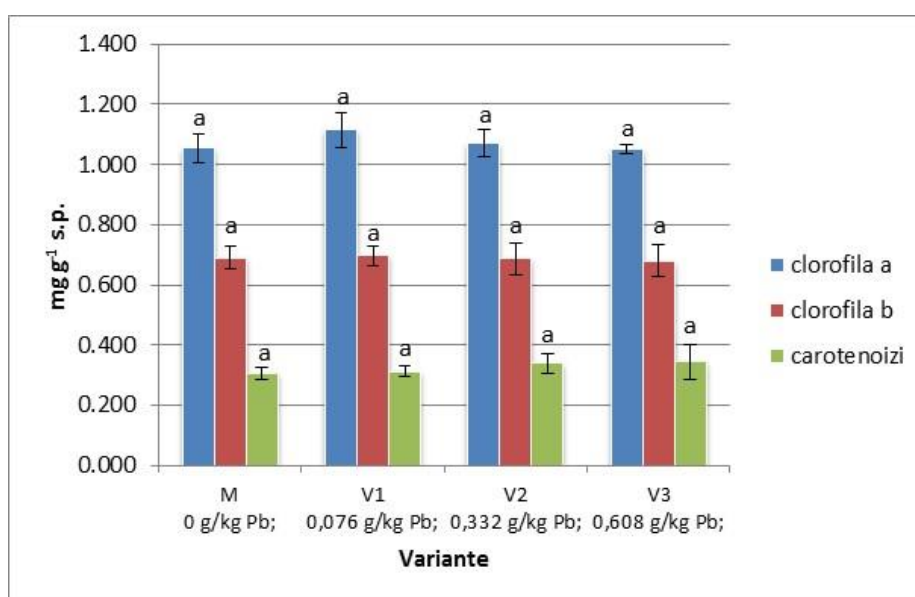


Fig. 7.5 Cantitatea de pigmenți asimilatori la *A. scolopendrium* după 5 luni de expunere la Pb

7.1.2 Influența Pb asupra intensității fotosintezei

Kalaji și Loboda (2007) consideră că, deși există numeroase lucrări în care este menționat efectul negativ al metalelor grele asupra fotosintezei, nu există o regulă clară prin care să se stabilească răspunsul plantelor la acest tip de stres. Fotosinteza este unul dintre cele mai sensibile procese fiziologice, iar efectul Pb asupra ei este unul variat (Singh și colab., 1997).

În prima lună, la cea mai mică concentrație de Pb s-a constatat o stimulare a fotosintezei (Fig. 7.6). În cea de-a doua lună, cea mai mare valoare pentru fotosinteză a fost determinată la V₁ (1,330 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), iar cea mică a fost obținută la V₄, aceasta fiind de 1,309 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Valorile determinate pentru fotosinteză la variantele cu Pb în a treia lună, s-au încadrat în intervalul 1,241-1,267 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, cea mai mare valoare a fotosintezei fiind obținută la martor (1,272 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). În a patra lună, determinările realizate pentru intensitatea fotosintezei au dus la obținerea unor valori cuprinse în intervalul 1,27-1,30 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, astfel încât nu s-au înregistrat diferențe semnificative între cele patru variante cu Pb în sol și varianta martor. În ultima lună, la V₁ și V₂ s-au obținut valori consecutive (1,236 $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ și 1,237 $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), iar la varianta cu cea mai mare concentrație de Pb valoarea obținută a fost cu 3% mai mică decât valoarea determinată la martor (Fig. 7.6).

Schwarzauer-Rockett și colab. (2013) au constatat că la concentrațiile de 100 și 200 mg L^{-1} $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, la specia *Pueraria montana* var. *lobata* rata fotosintezei și concentrația de clorofila *a* și *b* nu au fost influențate. Nici la concentrații de 10 ori mai mari (1000 și 2000 mg L^{-1}) Pb nu a influențat semnificativ cantitatea de clorofilă *a* și *b* la *Robinia pseudoacacia*, iar influența asupra fotosintezei a fost redusă (Dezhban și colab., 2015b).

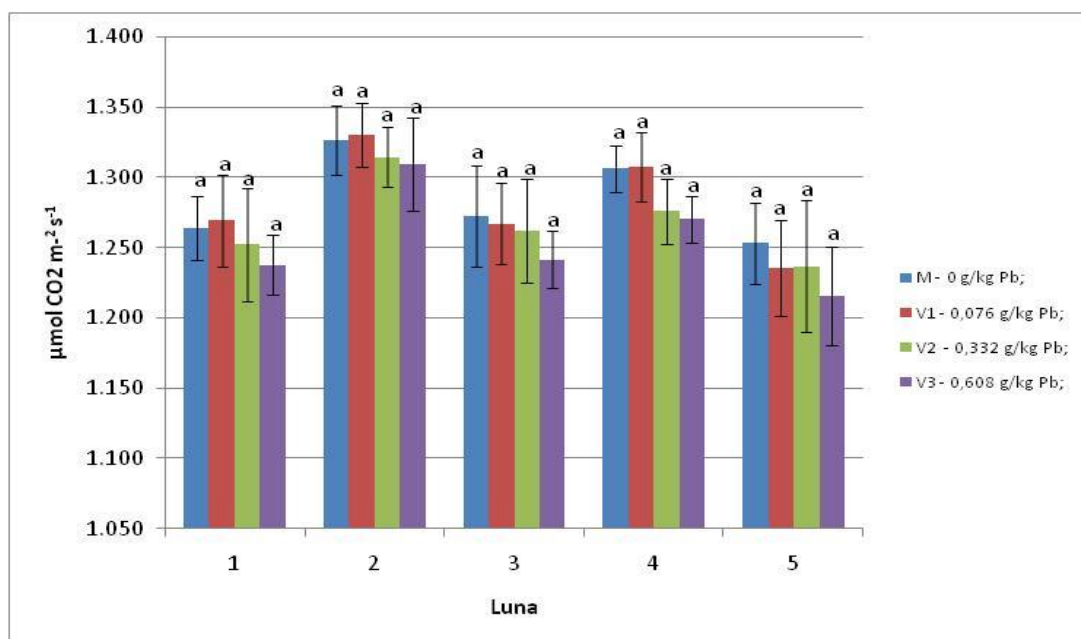


Fig. 7.6 Variația fotosintezei la exemplarele de *Asplenium scolopendrium* expuse la Pb

7.1.3 Influența Pb asupra intensității respirației

Dacă în cazul fotosintezei nu au fost obținute diferențe semnificative între variante, pentru respirație situația a fost total opusă. În prima lună valorile obținute pentru V_1 ($0,424 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) și V_4 ($0,425 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) au fost cu aproximativ 19% mai mari față de martor. O situație similară a fost constatată și în lunile următoare, martorul având cea mai scăzută rată a respirației. În a doua și a cincea lună, cele mai mari valori pentru respirație au fost determinate la V_4 , creșterile fiind cu 27% respectiv 33% mai mari decât valoarea obținută la martor. În a treia lună s-au obținut cele mai mari valori pentru respirație ($0,456 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ și $0,461 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) din cele 5 luni în care s-au făcut determinările, acestea fiind înregistrate la variantele cu concentrații mici de Pb (V_1 și V_2). În a patra lună valorile ratei respirației au fost mai mari cu 18% pentru V_1 , respectiv cu 26% pentru V_3 , față de valoarea înregistrată la martor (Fig.7.7).

Creșterea respirației la *Pisum sativum* expusă acțiunii Pb a fost observată de Parys și colab. (1998). Sharma și Dubey (2005) susțin că la concentrații scăzute, Pb stimulează respirația, însă mecanismul de stimulare încă nu este cunoscut. O posibilă explicație ar fi nevoia crescută de ATP rezultat în urma fosforilării oxidative care se acumulează în interiorul membranei mitocondriale. Respirația are un potențial mare în ceea ce privește capacitatea de compensare a stresului la care sunt supuse plantele, prin consolidarea sistemului respirator și a potențialului energetic al celulelor (Vodnik și colab., 1999a; Ratushnyak și colab., 2014).

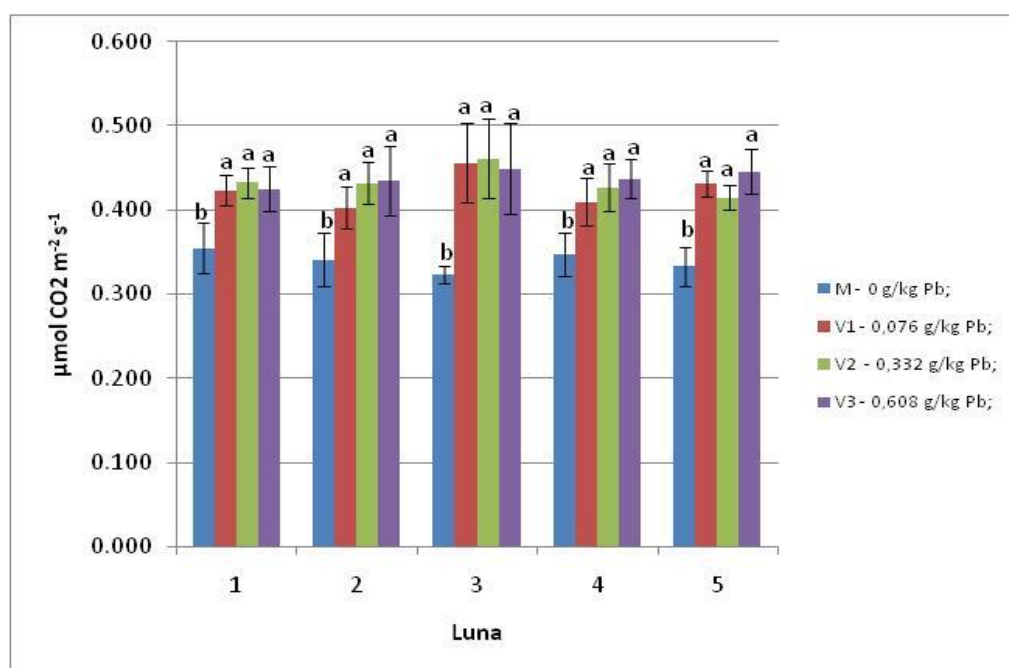


Fig. 7.7 Variația respirației la exemplarele de *Asplenium scolopendrium* expuse la Pb

În habitatele de origine, pentru specia *Asplenium scolopendrium*, intensitatea fotosintezei a variat de la 1,22 la 3,66 $\mu\text{moli CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ (Soare, 2011b), iar intensitatea respirației de la 0,305-0,915 $\mu\text{moli CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$. Pentru aceeași specie, cantitatea de clorofilă *a* a fost de 5,65 mg g^{-1} s.p,

cea de clorofilă *b* a fost de 3,93 mg g⁻¹ s.p., iar pentru pigmentii carotenoizi s-a determinat o cantitate de 1,75 mg g⁻¹ s.p.

7.1.4 Influența Pb asupra activității catalazei

Pb produce stres oxidativ la nivelul plantelor, iar pentru combaterea acestuia se sintetizează enzime antioxidante care pot elimina radicalii liberi. Din această categorie face parte și catalaza, prima enzimă descoperită și caracterizată (Mhamdi și colab., 2010), care descopune H₂O₂ în H₂O și O₂. La V₁ după prima și a treia lună de expunere, s-au obținut valori apropiate: 14,244 și 14,340 ml KMnO₄ g⁻¹s.p., diferite semnificativ de martor și de celelalte variante (Fig. 7.8). O situație similară a fost observată și la V₂ în prima și a doua lună, valorile fiind de aproximativ 16 ml KMnO₄ g⁻¹s.p. Tot în a doua lună, cea mai mare valoare obținută pentru catalază a fost la varianta cu cel mai mare conținut de Pb (17,55 ml KMnO₄ g⁻¹ s.p.), aceasta fiind cu 20% mai mare decât valoarea obținută la martor. Măsurătorile după trei și cinci luni de expunere la Pb, au obținut cele mai mari valori pentru catalază, cu aproximativ 30% mai mari față de martor. Și în luna a 4-a se poate observa o tendință ascendentă a catalazei, cea mai mare creștere fiind cu 2,96 unități la V₃ față de martor; de asemenea au existat diferențe semnificative între martor și V₁₋₃.

În ultima lună, la variantele cu concentrații mici de Pb s-au obținut valori apropiate pentru catalază 12,426 ml KMnO₄ g⁻¹s.p. (V₁) și 12,638 ml KMnO₄ g⁻¹s.p. (V₂), acestea fiind cu aproximativ 13% mai mari decât valoarea obținută la martor și cu 17% mai mici decât valoarea determinată la V₃ (Fig. 7.8).

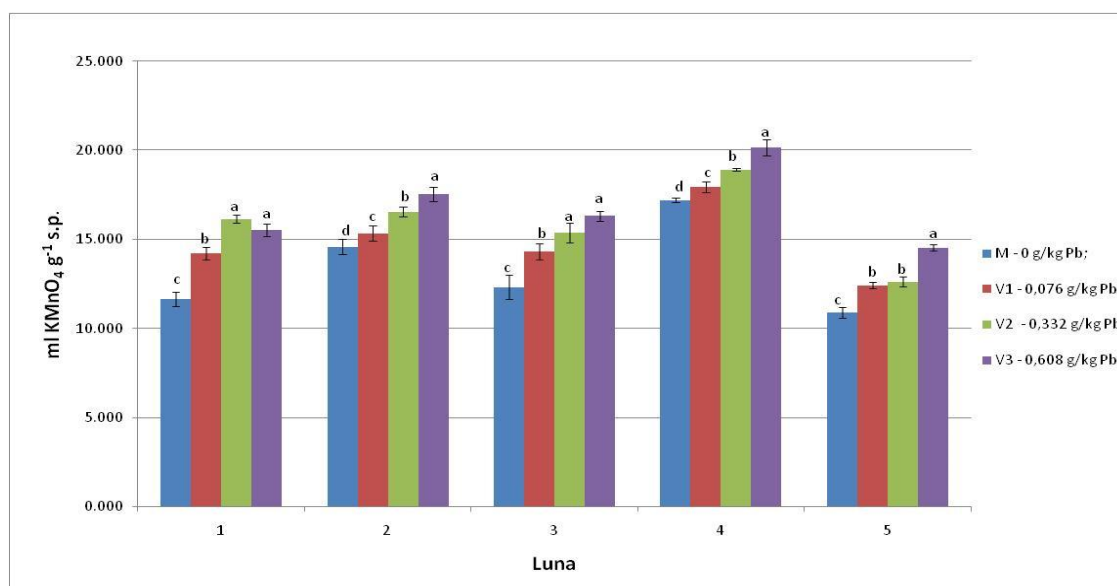


Fig. 7.8 Variația activității catalazei la exemplarele de *Asplenium scolopendrium* expuse la Pb

Creșterea activității catalazei ca urmare a stresului determinat de Pb a fost semnalată și de Verna și Dubey (2003), Keser și Saygiderger (2010), Shu și colab., (2012), Naghavi (2014), Ravikumar și Thamizhiniyyn (2014). La specia *Hibiscus esculentus* activitatea catalazei s-a intensificat ca urmare a expunerii la concentrații de 5, 10, 20, 40 mM Pb²⁺ pe o perioadă de 4 săptămâni (Youssef și Azooz, 2013). Zhu și colab. (2012) au studiat efectul Pb asupra speciei *Pteris vittata*. Studiile lor au arătat că odată cu creșterea concentrației de Pb (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 mg L⁻¹) activitatea catalazei a crescut atingând maximum la concentrația de 1000 mg L⁻¹. În frunzele de *Polygonum pubescens* activitatea catalazei a atins maximum la concentrația de 2 nmol L⁻¹ (Li și colab., 2011). De asemenea au fost observate activități ridicate ale catalazei la variantele cu Pb comparativ cu martorul (Saha și Bhattacharjee, 2014).

CONCLUZII

Concluzii referitoare la influența metalelor grele asupra gametofitului ferigilor

- ✓ Metalele grele au influențat în sens negativ germinarea sporilor: astfel, creșterea concentrației de metal în mediu a dus la scăderea procentului de spori germinați, iar procesul de germinație a fost decalat în timp. În general, cel mai mic procent germinativ a fost determinat la specia *Asplenium scolopendrium*.
- ✓ Diferențierea gametofitului a suferit modificări sub influența metalelor grele: sporii germinați au devenit necrotici, protalele, filamentele și lamele protaliene s-au decolorat din cauza afectării pigmentilor clorofilieni; de asemenea, au apărut mase celulare protaliene tridimensionale.
- ✓ Influența metalelor grele asupra gametofitului a variat în funcție de mediul de cultură (fiind mult mai accentuată la variantele crescute pe soluție Knop, comparativ cu cele crescute pe sol), de specia de plantă și de metal.
- ✓ La variantele de culturi realizate pe soluție Knop, în prezența Ni ($0,25 - 1,5 \text{ g Ni}^{2+} \text{ L}^{-1}$) nu a fost înregistrată germinație; situația a fost similară și pentru variantele care au avut concentrații mari de Pb ($1-1,5 \text{ Pb}^{2+} \text{ L}^{-1}$).
- ✓ Conținutul de pigmenți a fost stimulat la concentrații scăzute de metale grele în mediul de cultură, rezultat explicat prin fenomenul denumit hormeză în toxicologie, respectiv un efect de stimulare la concentrații scăzute de substanțe toxice sau alți factori de stres și un efect de inhibare la concentrații mari.
- ✓ Creșterea conținutului de carotenoizi și polifenoli în gametofit reprezintă un mecanism de protecție față de stresul cronic produs de metalele grele.
- ✓ Modificările constatate la nivelul gametofitului pot sta la baza standardizării unor teste de toxicitate cronică utile în evaluarea riscului de mediu, reprezentând în același timp biomarkeri nespecifici.

Concluzii referitoare la influența metalelor grele asupra sporofitului ferigilor

- ✓ Metalele grele au afectat caracteristicile biometrice ale frunzelor, mai ales în ceea ce privește grosimea laminei, mezofilului și dimensiunea stomatelor; după expunerea la metale grele în frunzeau fost evidențiate depozite de tanin și acumulări de polifenoli.
- ✓ Metale grele au influențat echilibrul hidric al plantelor: s-a observat o tendință de reducere a conținutului de apă (apa liberă, legată și totală) odată cu creșterea timpului de expunere.
- ✓ La nivelul sporofitului conținutul antioxidanților non enzimatici din frunze a fost stimulat de concentrațiile scăzute de metale grele: de exemplu concentrațiile $0,025 \text{ g kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$; $0,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$ și $0,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ au stimulat cantitatea de prolină, iar conținutul total de polifenoli a crescut la concentrațiile $0,25 \text{ g kg}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$ și $0,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$.
- ✓ În ceea ce privește analiza compoziției chimice a frunzelor, expunerea plantelor la stresul produs de metalele grele determină separarea componentelor principale, deplasări de benzi clare și scăderi ale absorbantei.
- ✓ Stresul determinat de expunerea la metale grele a fost compensat de mecanismele antioxidante: creșterea conținutului de carotenoizi, creșterea activității enzimaticice (SOD, CAT, POX), a conținutului total de polifenoli și prolină.
- ✓ Sporofitul speciei *Asplenium scolopendrium* constituie un model excelent pentru experimentele efectuate ex situ, plantele aclimatizându-se foarte ușor și, în plus, datorită frunzelor holociclice biomonitorizarea se poate realiza pe termen mai lung, comparativ cu speciile care au frunze monociclice.
- ✓ Modificările parametrilor histologici, fiziologici și biochimici determinate la nivelul frunzei speciei *Asplenium scolopendrium* constituie un punct important de plecare pentru standardizarea unor teste de toxicitate cronică utile pentru evaluarea mediului poluat cu metale grele.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Aldea F., Helepciuc F.E., Banciu C., Brezeanu A., Soare L.C., 2013, Comparative studies between ferns gametophyte and sporophyte by bidimensional electrophoresis. Oltenia. Studii și comunicări. Științele naturii Tom 29(1):120-124.
2. Ayeni O.O., Ndakidemi P.A., Snyman R.G., Odendaal J.P., 2010, Chemical, biological and physiological indicators of metal pollution in wetlands, Scientific Research and Essays 5(15):1938-1949.
3. Banciu C., Carasan M.E., Brezeanu A., 2009, In vitro propagation of the endangered species *Marsilea quadrifolia* L. - morphological and biochemical analysis of the regenerates, Romanian Biotechnological Letters 14(1): 4139-4145.
4. Bercu R., 1999, The structural organization of the corm in some polypodiaceae (*Pteridophyta*) with Special Reference to the Vascular System, PhD Thesis, Babeș-Bolyai University, Cluj-Napoca.
5. Cassanego M.B.B., Droste A., Windisch P.G., 2010, Effects of 2, 4-D on the germination of megaspores and initial development of *Regnellidium diphyllum* Lindm. (*Monilophyta, Marsileaceae*), Brazilian Journal of Biology, Elsevier, Rio de Janeiro, 70(2):361-366.
6. Catalá M., Esteban M., Quintanilla L.G., 2011, Mitochondrial activity of fern spores for the evaluation of acute toxicity in higher plant development. In: Working with Ferns, Issues and Applications, (eds) Fernández H., Kumar A., Revilla M.A., Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 237-247.
7. Dezhban A., Shirvany A., Attarod P., Delshad M., Matinizadeh M., Khoshnevis M., 2015b, Cadmium and lead effects on chlorophyll fluorescence, chlorophyll pigments and proline of *Robinia pseudoacacia*, J For Res 26(2):323–329.
8. Dorin D., 2000, Morphological and histo-anatomical research on the *Filicatae* species (*Pteridophyta*) of the Romanian flora, PhD Thesis, Al. I. Cuza University of Iași.
9. Droste A., Brizola Cassanego M.B., Windisch P.G., 2010, Germination and sporophytic development of *Regnellidium diphyllum* Lindm. (*Marsileaceae*) in the presence of a glyphosate-based herbicide, Brazilian Journal of Biosc. Elsevier. Rio de Janeiro 8(2): 174-178.
10. Gadd G.M., 2010, Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology. Elsevier. Stuttgart. 156:609-643.
11. Gostin I., 2007, Markeri biologici morfologici, structurali și ultrastructurali utilizați pentru evaluarea impactului antropic asupra ecosistemelor, Biomarkeri structurali la plante. Editura Universității Al.I. Cuza, Iași: 85-162.

12. Gupta M., Devi S., Singh J., 1992, Effects of long-term low-dose exposure to cadmium during the entire life cycle of *Ceratopteris thalictroides*, a water fern, Archives of Environmental Contamination and Toxicology 23(2):184-189.
13. Gupta M., Devi S., 1992, Effect of Cadmium on spore germination and gametophyte development in some ferns, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 48:337-343.
14. Kalaji H.M., Loboda T., 2007, Photosystem II of barley seedlings under cadmium and lead stress, Plant Soil Environ 53(12):511–516.
15. Kamachi H., Komori I., Tamura H., Sawa Y., Karahara I., Honma Y., Wada N., Kawabata T., Matsuda K., Ikeno S., Noguchi M., Inoue H., 2005, Lead tolerance and accumulation in the gametophytes of the fern *Athyrium yokoscense*, Journal of Plant Research 118:137-145.
16. Kaznina N.M., Laidinen G.F., Titov A.F., Talanov A.V., 2005, Effect of lead on the photosynthetic apparatus of annual grasses, Biology Bulletin 32:147-150.
17. Keary P. I., Thomas C., Sheffield E., 2000, The effect of the herbicide Asulam on the gametophytes of *Pteridium aquilinum*, *Cryptogramma crista* and *Dryopteris filix-mas*, Annales of Botany. Oxford Journals. 85:47-51.
18. Keser G., Saygideger S., 2010, Effects of lead on the activities of antioxidant enzymes in watercress, *Nasturtium officinale*, R. Br Biol Trace Elem Res 137(2):235–243.
19. Kieling-Rubio M.A., Droste A., Windisch P.G., 2012, Effects of nickel on the fern *Regnellidium diphyllum*, Brazilian Journal of Biology. Elsevier. Rio de Janeiro.72(4):807-811.
20. Krupa Z., Baranowska M., Orzol D., 1996, Can anthocyanins be considered as heavy metal stress indicator in higher plants? Acta Physiol Plant 18:147–151.
21. Li Y., Liu K.-h., Yu F.-m., Deng H., Yang D.-l., Zhou Z.-m., Liu H., Li M.-s., 2011, Effects of manganese on enzymatic and non-enzymatic antioxidative defenses of the hyperaccumulate *Polygonum pubescens* Blume, Journal of Agro-Environment Science 30(12):2422-2427.
22. Luo X-Y., Ikeda H., 2007, Effects of four rice herbicides on the growth of an aquatic fern, *Marsilea quadrifolia* L, Weed Biology and Management. Society of Japan. Tokio. 7(4): 237-241.
23. Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G., 2010, Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models, J Exp. Bot. 61(15):4197–4220.
24. Michalak A., 2006, Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress, Pol. J. Environ. Stud. 15(4):523–525.

25. Muccifora S., 2008, Effects of copper on spore germination, growth and ultrastructure of *Polypodium cambricum* L. Gametophytes, Environ Pollut. 153(2):369-75.
26. Naghavi F., 2014, Effects of lead and zinc on seed germination and seedling growth of soybean (*Glycine max* L.), Int J Biosci 4(11):306–315.
27. Nishizono H., Suzuki S., Ishii F., 1987, Accumulation of heavy metals in the metal-tolerant fern *Athyrium yokoscense* growing on various environments, Plant Soil. Springer. Berlin. 102: 65-70.
28. Olivares E., 2003, The effect of lead on the phytochemistry of *Tithonia diversifolia* exposed to roadside automotive pollution or grown in pots of Pb-supplemented soil, Braz J Plant Physiol 15(3):149–158.
29. Orțan A., Fierăscu I., Ungureanu C., Fierăscu R. C., Avramescu S. M., Dumitrescu O., Dinu Pîrvu C. E., 2015, Innovative phytosynthesized silver nanoarchitectures with enhanced antifungal and antioxidant properties, Applied Surface Science. Elsevier. London: 540-548.
30. Parys E., Romanowska E., Siedlecka M., Poskuta J. W., 1998, The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*, Acta Physiol Plant 20(3):313-322.
31. Patra R.C., Rautray A.K., Swarup D., 2011, oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration, Vet. Med. Int.1-9.
32. Perveen A., Wahid A., Javed F., 2011, Varietal differences in spring and autumn sown maize (*Zea mays*) for tolerance against cadmium toxicity, International Journal Agriculture and Biology. Friends Science Publishers. Kabul. 13: 909-915.
33. Ratushnyak A.Y., Andreeva M.G., Chakhirev I.V., Trushin M.V., 2014, Characteristics of the respiratory metabolism of *Typha angustifolia* under influence of lead, Biol Med 6(4):1–6.
34. Ravikumar S., Thamizhiniyazn P., 2014, Impact of lead on growth, biochemical and enzymatic changes in black gram, Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci. 4(4):1–3.
35. Rossato L. V., Nicoloso F. T., Farias J. G., Cargnelluti D., Tabaldi L. A., Antes F. G., Dressler V. L., Morsch V. M., Schetinger M. R., 2012, Effects of lead on the growth, lead accumulation and physiological responses of *Pluchea sagittalis*, Ecotoxicology. Springer. New York. 21(1): 111-123.
36. Saha S., Bhattacharjee C., 2014, Effect of lead acetate on bengal gram seeds, International Journal of Clinical and Diagnostic Research, 3(2):II.
37. Schwarzaue-Rockett K., Al-Hamdani S.H., Rayburn J.R., Mwebi N.O., 2013, Utilization of kudzu as a lead phytoremediator and the impact of lead on selected physiological responses, Can J Plant Sci 93:951–959.

38. Sharma P., Dubey S., 2005, Lead toxicity in plants, *Braz. J. Plant Physiol.* 17(1): 35-52.
39. Sheffield E., 2002, Effects of Asulam on non-target pteridophytes, *British Fern Gazette*. London. 16: 377-382.
40. Shu X., Yin L., Zhang Q., Wang W., 2012, Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L., *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19(3):893–902.
41. Singh G.K., 2014, Effect of Cadmium on Seed Germination, Photosynthesis and Biochemical Aspects of Pea Seedlings, *Biology Chemistry Research*. Elsevier. London. 31(2): 623-637.
42. Singh R.P., Tripathi R.D., Sinha S.K., Maheshwari R., Srivastava H.S., 1997, Response of higher plants to lead contaminated environment, *Chemosphere* 34(11):2467-93
43. Soare L.C., 2011a, Embriogeneza zigotică și somatică la unele pteridofite, Editura Universității din Pitești
44. Soare L.C. (coord.), 2011b, Conservarea diversității pteridofitelor din Valea Vâlsanului Editura Universității din Pitești.
45. Soare L.C., Dobrescu C.M., Diaconescu C.G., 2014, Research on the influence of lead acetate on the gametophyte of some pteridophyte species, *Annals of West University of Timișoara, ser. Biology* XVII(1):49-56.
46. Soare L.C., Dobrescu C.M., Popescu M., Boeru A.G., 2013a, The Effects of Some Pesticides on Spore Germination and Gametophyte Differentiation in *Athyrium filix-femina* (L.) Roth. and *Polypodium vulgare* L., *Not. Bot. Horti. Agrobo.* 41(2):458-462.
47. Soare L.C., Dobrescu C.M., Drăghiceanu O.A. 2013b. The response of pteridophyte spores and gametophytes to the presence of heavy metals in their culture media, *Annales of University Craiova, Serie Biology*. Universitaria Press. Craiova. 17(54): 657-662.
48. Soare L.C., Dobrescu C.M., Popescu A.G., 2013c, The influence of a copper-containing fungicide on the gametophyte of some non-target pteridophyte species, *Acta Horti Botanical. Bucharest.* 40: 49-56.
49. Soare L.C., Ferdeș M., Stefanov S., Denkova Z., Nicolova R., Denev P., Bejan C., Păunescu A., 2012, Antioxidant activity, polyphenols content and antimicrobial activity of several native pteridophytes of Romania, *Notulae Botanicae, Horti Agrobotanici, Cluj-Napoca*, 40(1): 53-57.
50. Soare L.C., Șuțan A.N., 2018, Current trends in pteridophyte extracts: from plant to nanoparticles. In *Current Advances in Fern Research*, (ed.) Fernandez H., Springer, 329-357.

51. Soare L.C., Vişoiu E., Bejan C., Dobrescu C.M., Fierăscu I., Iosub I., Păunescu A., 2015, Research on the *in vitro* bioaccumulation capacity of lead in some pteridophyte species of the romanian flora, REV. CHIM. (Bucharest) 66(12):2017-2020.
52. Verna S., Dubey R.S., 2003, Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants, Plant Sci. 164(4):645–655.
53. Vodnik D., Gaberščik A., Gogala N., 1999a, Lead phytotoxicity in Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.): the effect of Pb and Zeatin - Riboside on root respiratory potential, Phyton (Austria) Special issue: Plant Physiology 39(3):155-159.
54. Wahid A., Ghani A., Javed F., 2008, Effect of cadmium on photosynthesis, nutrition and growth of mungbean, Agronomy for Sustainable Development 28(2):273-280.
55. Wiszniewska A., Hanus-Fajerska E., Smoleń S., Muszyńska E., 2015, In vitro selection for lead tolerance in shoot culture of *Daphne* species, Acta. Sci. Pol. Hortorum. Cultus. 14(1):129–142.
56. Youssef M.M., Azooz M.M., 2013, Biochemical studies on the effects of zinc and lead on oxidative stress, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in okra (*Hibiscus esculentus* v. Hassawi), Sci. Int. 1(3):29–38.
57. Zhu Q., Xia H., 2012, Effects of lead stress on antioxidant enzyme system and chlorophyll content of *Pteris vittata*, Guizhou Agric. Sci. 40(4):56–58.