

CZU: 635.25:576.353

DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.4979997>

## STUDIUL DIVIDERILOR MITOTICE ÎN MERISTEMELE RADICULARE LA *ALLIUM CEPA* L. SUB INFLUENȚA STRUCTURILOR NANOCOMPOZITE BAZATE PE OXIZII VANADIULUI

*Maria FRUNZĂ, Ana BÎRSAN*

*Universitatea de Stat din Moldova*

În lucrarea de față a fost studiată influența structurilor nanocompozite bazate pe oxizii vanadiului asupra dividerilor mitotice în meristemele radiculare la *Allium cepa* L. Analiza citologică a constatat prezența mitozelor anormale în variantele experimentale cu expunere la nanocompozite, având la bază dereglări ale fusului de diviziune. Acest fapt denotă caracterul citotoxic și genotoxic al materialelor studiate.

**Cuvinte-cheie:** meristeme radiculare, *Allium cepa* L., structuri nanocompozite, oxizii vanadiului, activitate mitotică, indice mitotic, acțiune citotoxică, acțiune genotoxică, aberațiuni cromozomiale.

### THE STUDY OF MITOTIC DIVISIONS IN *ALLIUM CEPA* L. RADICULAR MERISTEMS UNDER THE INFLUENCE OF NANOCOMPOSITE STRUCTURES BASED ON VANADIUM OXIDES

In the present work the influence of nanocomposite structures based on vanadium oxides on the mitotic divisions in radicular meristems at *Allium cepa* L. was studied. The cytological analysis revealed the presence of abnormal mitoses and chromosomal aberrations in the experimental variants with exposure to nanocomposites, based on division spindles. This indicates the cytotoxic and genotoxic character of the studied materials.

**Keywords:** root meristems, *Allium cepa* L., nanocomposite structures, vanadium oxides, mitotic activity, mitotic index, cytotoxic action, genotoxic action, chromosomal aberrations.

### Introducere

Țesuturile meristemate conțin celule ce reacționează rapid și activ la factorii endogeni și exogeni, iar conservatismul proceselor proliferative asigură posibilitatea utilizării diferitor parametri ai dividerilor mitotice în studiile de monitoring [1,2]. Conform datelor mai multor autori, în cercetările citogenetice în calitate de test-sistemă comodă, sensibilă și ușor de manipulat servește ceapa (*Allium cepa* L.) – cultură bine studiată din punct de vedere genetic [3-5].

La etapa actuală nanomaterialele sunt utilizate pe larg în diverse domenii: medical, comercial și în practici industriale de producție [6]. În pofida progresului rapid și acceptării precoce a nanotehnologiilor, potențialul acestora pentru diverse efecte adverse asupra omului, biotelor non-umane și ecosistemelor încă nu este bine elucidat. Există o serie de discuții cu privire la utilizarea nanomaterialelor, în special în ceea ce privește riscurile și pericolele pentru sănătate. În acest context, în ultimii ani s-a înregistrat o creștere rapidă a studiilor experimentale privind toxicitatea și pericolele biologice ale nanomaterialelor în mediu [7-9].

În această lucrare ne-am propus drept scop testarea unor nanomateriale ce pot influența, în diferite moduri, mecanismele diviziunii celulare și proliferarea celulară la etape timpurii ontogenetice.

### Material și metode

Ca metodă de lucru am ales metoda teoretică, prin consultarea unei vaste bibliografii, și metoda practică, prin care am testat influența nanomaterialelor propuse asupra proceselor proliferative și, implicit, a diviziunii mitotice, utilizând metoda *Allium* test.

În cadrul experimentului au fost folosite plăci din piroc ceramică acoperite cu un strat subțire de aluminiu și o peliculă de oxizi ai vanadiului, obținută prin evaporarea termică în vid a vanadiului metalic de la suprafața plăcii, urmată de oxidarea termică în aer a straturilor subțiri obținute [10]. Straturile subțiri obținute reprezintă o structură complicată de dimensiuni nanometrice cu prezența fazelor oxizilor proprii ai vanadiului de tip VO<sub>2</sub>, V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> și V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Pentru conveniență, vom utiliza pe parcurs denumirea simplificată de „plăci acoperite cu nanocompozite bazate pe oxizii vanadiului” (PNCOV).

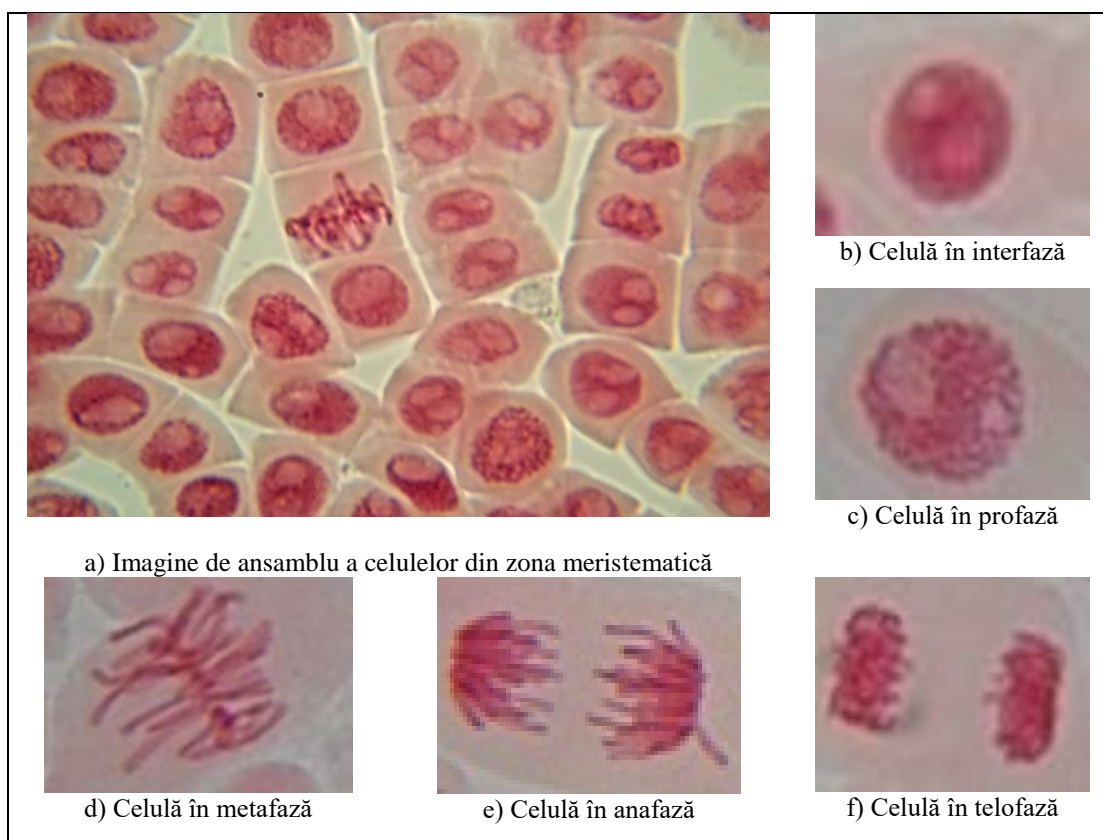
În calitate de material biologic s-au utilizat semințe de ceapă soiul Holtedon. Expunerea semințelor de ceapă la PNCOV s-a făcut prin plasarea semințelor pe plăci pe durate de timp diferite (48 h și 72 h), anterior germinării. În calitate de control au servit semințele care nu au fost expuse la plăcile cu nanocompozite. Germinarea semințelor s-a realizat în cutii Petri tapetate cu hârtie de filtru, umectată cu apă distilată, care au fost plasate în termostat la temperatura de +24°C, în întuneric, pentru a exclude influența ritmurilor de lumină asupra valorii indicelui mitotic. Semințele au fost germinate timp de 5 zile. Pentru studii citologice au fost prelevate rădăcini cu lungimea de 1-2 cm și fixate în amestec de acid acetic-alcool (3:1) timp de 24 h la frigider (+4°C), după care au fost transferate în soluție de alcool 70° și păstrate la rece în vase închise. Ulterior, probele au fost spălate în apă distilată. Pentru hidroliză și colorare, materialul biologic s-a fiert timp de 5 minute la baie de apă în 10-12 ml de soluție de carmină acetică de 2%. După fierbere probele biologice au fost trecute în apă acetică 45%. Preparatele microscopice au fost executate prin metoda *squash*. Examinarea preparatelor s-a făcut cu obiectivul 40× în vederea stabilirii numărului de celule aflate în interfază și în diferite faze ale mitozei.

După examinarea preparatelor microscopice au fost calculați indicii mitotici și indicii fazici ai mitozei. Datele au fost prelucrate statistic [11].

### Rezultate și discuții

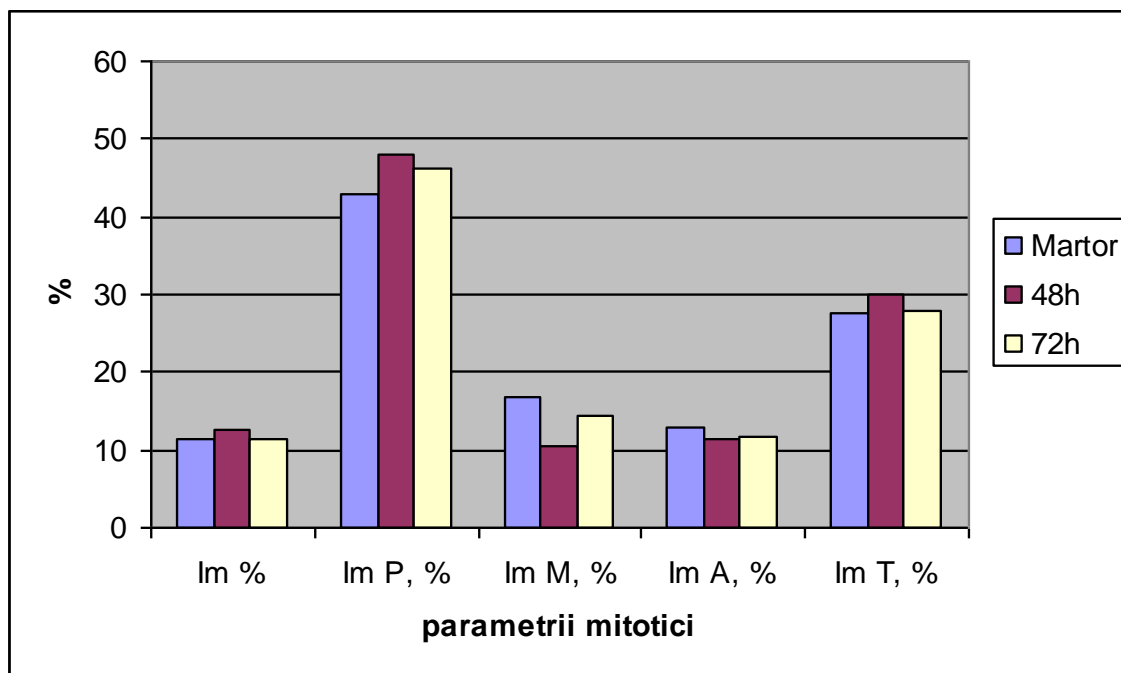
În studiile citogenetice ale mitozei cu succes se utilizează mai mulți parametri, inclusiv indicele mitotic care reflectă reacția genotipului la acțiunea diferitor factori, reprezentând mecanismul de adaptare a organismului exprimat la nivel celular, orientat spre menținerea homeostazei în sistemele celulare. Indicele mitotic constituie un criteriu important utilizat în aprecierea proceselor de proliferare și a acțiunii mito-modificative a diverșilor factori [2,5].

Pentru calcularea indicelui mitotic este importantă identificarea corectă a fazelor diviziunii celulare. În Figura 1 este reprezentată o imagine de ansamblu a preparatului citologic din rădăcinile de ceapă din varianta martor (a) care conține celule în interfază (b) și celule în diferite faze ale mitozei (c, d, e, f).



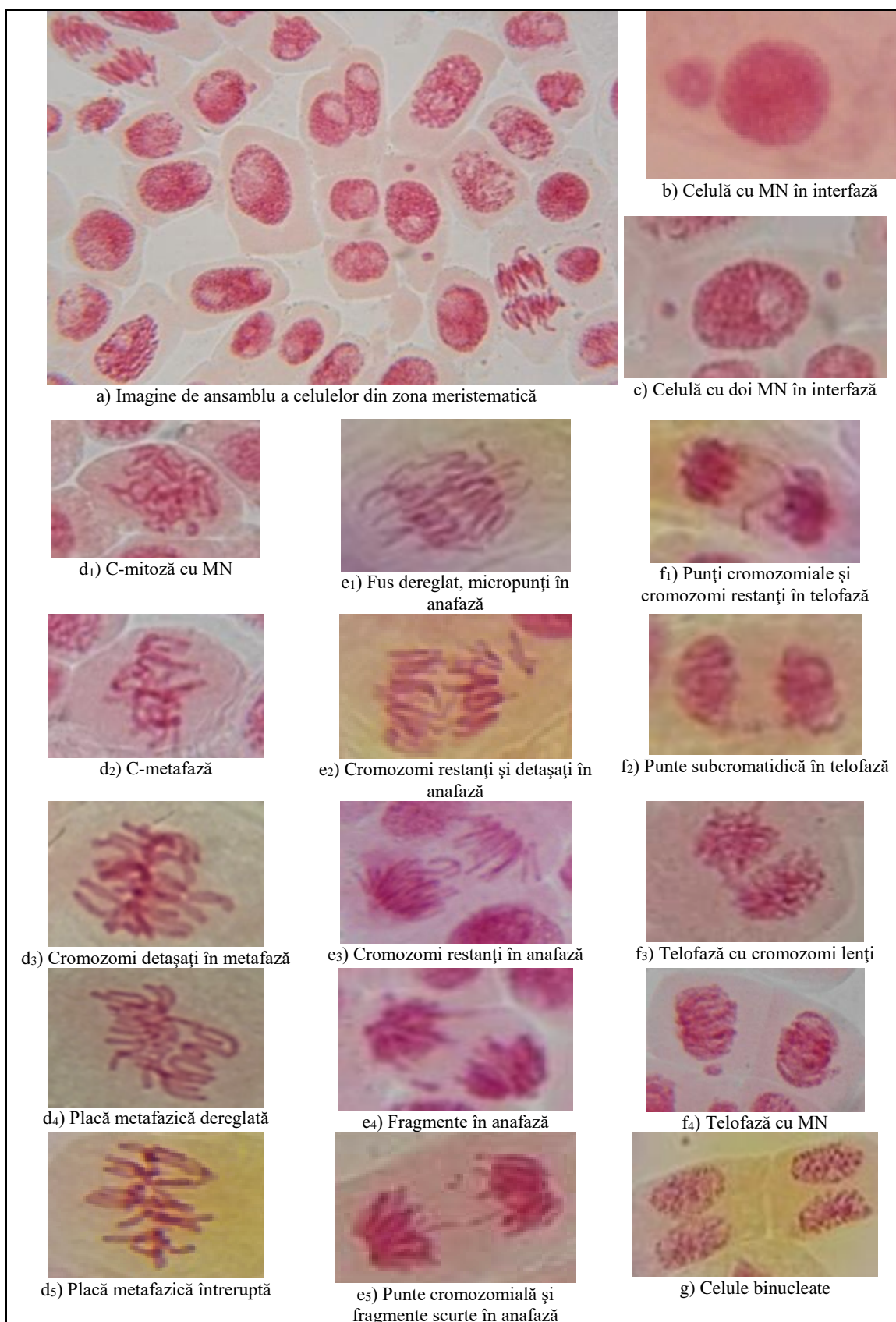
**Fig.1.** Celule meristemice normale (varianta martor) în interfază și în diferite faze ale diviziunii celulare la *Allium cepa* L.

Conform rezultatelor studiului citologic, valoarea indicelui mitotic în varianta martor a constituit 11,42%. La expunerea semințelor la PNCOV se observă o variație inexplicabilă a indicelui mitotic (Fig.2). Cea mai mare deviere a valorii indicelui mitotic a fost constatată în cazul expunerii semințelor la PNCOV pe o durată de 48 h, înregistrând o creștere de la 11,42% (în cazul martorului) la 12,58% (în cazul variantei experimentale). În cazul expunerii semințelor la PNCOV pe o durată de 72 h indicele mitotic descrește și se apropie de cel al martorului (11,40%).

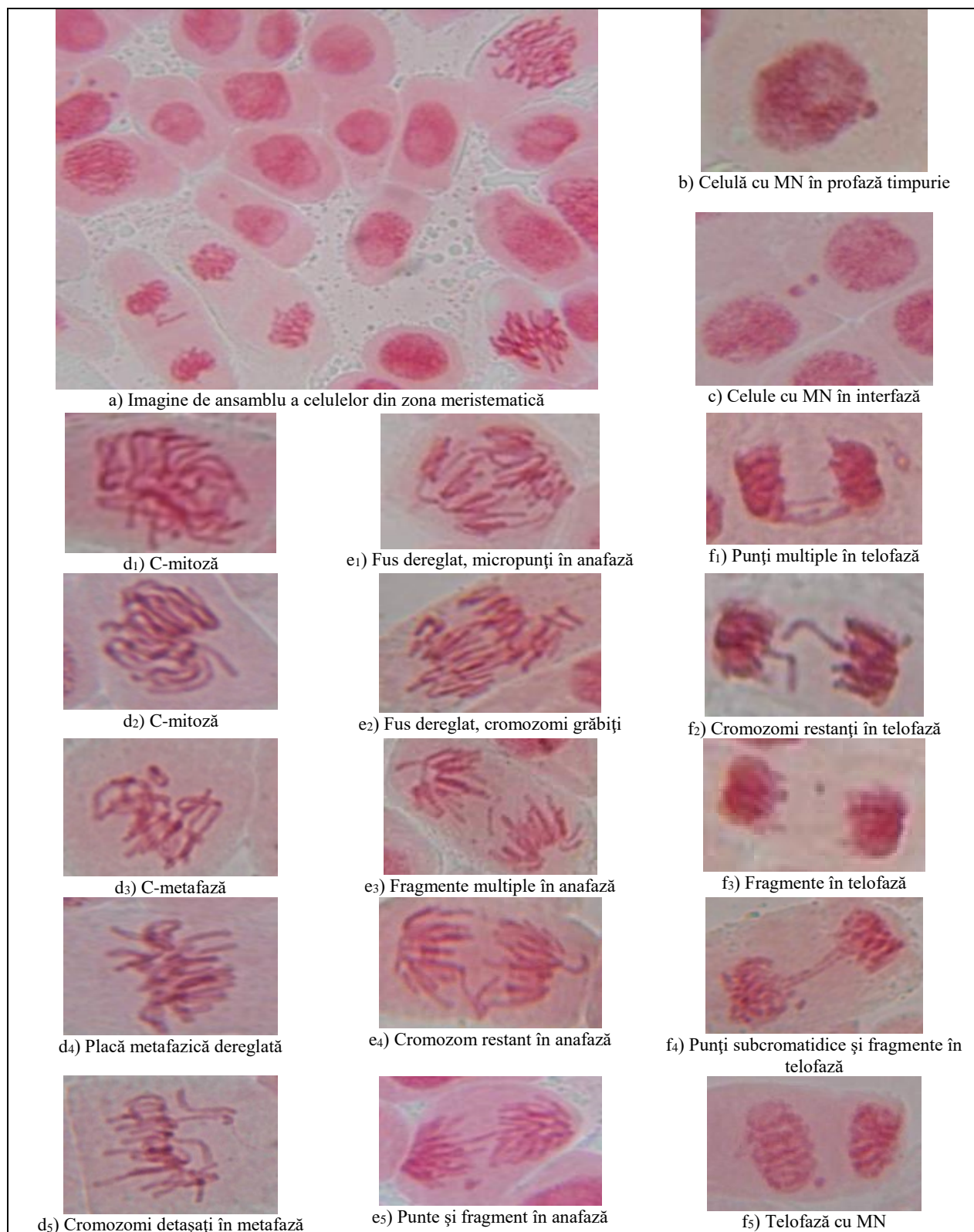


**Fig.2.** Variația indicelui mitotic ( $I_m$ ) și a indicilor fazici ai mitozei ( $I_m P, \%$ ;  $I_m M, \%$ ;  $I_m A, \%$ ;  $I_m T, \%$ ) în condiții normale și sub influența plăcilor acoperite cu nanocompozite bazate pe oxizii vanadiului.

Pentru a descoperi eventuale modificări în activitatea mitotică, au fost analizați indicii fazici ai mitozei în varianta martor și în variantele experimentale. În ambele variante experimentale, 48 h și 72 h, au fost înregistrate fluctuații ale valorilor indicilor fazici ai mitozei, comparativ cu martorul (Fig.2). Astfel, s-a constatat creșterea indicelui profazic în variantele experimentale, respectiv cu 12,24% (expunerea 48 h) și 7,66% (expunerea 72 h), comparativ cu martorul. De asemenea, crește indicele telofazic cu 8,45%, comparativ cu martorul, în varianta cu durata expunerii de 48 h. Creșterea indicilor profazic și telofazic poate fi explicată prin faptul că celulele parcurg mai lent aceste faze; ca rezultat, este afectată durata ciclului celular [12]. Indicele metafazic s-a micșorat comparativ cu martorul, înregistrând valori mai mici cu 36,41% (expunerea 48 h) și cu 14,28% (expunerea 72 h). Indicele anafazic de asemenea s-a micșorat. Cea mai semnificativă descreștere a indicelui anafazic (cu 11,78%) s-a constatat în cazul expunerii la PNCOV pe durata de 48 h. Perturbarea fazelor diviziunii celulare indică faptul că PNCOV modifică activitatea mitotică prin dereglarea citoscheletului și interferează cu formarea fusului mitotic. Acest fapt este confirmat de apariția mitozelor anormale (Fig.3,4). În ambele variante experimentale au fost identificate anomalii cromozomiale: C-mitote, dereglări de fus metafazice, dereglări de fus ana-telofazice, punți ana-telofazice, cromozomi restanți, fragmente (Fig.3,4).



**Fig.3.** Aberațiuni cromozomiale observate în celulele meristematice la *Allium cepa* L., expusă la acțiunea plăcilor acoperite cu nanocompozite bazate pe oxizii vanadiului timp de 48 de ore.



**Fig.4.** Aberațiuni cromozomiale observate în celulele meristematice la *Allium cepa* L. expusă la acțiunea plăcilor acoperite cu nanocompozite bazate pe oxizii vanadiului timp de 72 de ore.

Ponderea aberațiilor cromozomiale în varianta martor constituie 3,85% din numărul total de celule aflate în diviziune, ceea ce depășește pragul normal (2%) al mutagenzei spontane. Expunerea semințelor la PNCOV determină creșterea numărului de mitoze anormale: de 1,74 ori (expunerea 48 h) și de 2,70 ori (expunerea 72 h).

Spectrul de aberațiuni cromozomiale include punți cromozomiale și cromatidice, cromozomi restanți și fragmente de cromozomi singulare, duble sau multiple – rezultat al delețiilor și translocațiilor, care duc la formarea micronucleelor. În acest context este important a menționa că în ambele variante experimentale au fost identificate celule cu 1 sau 2 micronuclee (Fig.3 (a, b, c); Fig.4 (a, b, c)) și celule binucleate (Fig.3 (g)), care reprezintă un indicator al mutațiilor sus-menționate.

În Tabel este prezentat spectrul și ponderea diferitor aberațiuni cromozomiale, depistate în loturile analizate. În toate variantele analizate predomină dereglările de fus în metafază, anafază și C-mitozele. Apariția anomaliilor de tipul C-mitozelor se consideră a fi rezultatul restructurării fusului de diviziune [13,14]. De asemenea, motiv al C-mitozelor poate fi dublarea numărului de cromozomi. În lipsa citochinezei, acestea pot genera celule poliploide sau bi(poli)nucleate (Fig.3 (b, c, g); Fig.4 (b, c)).

Tabel

**Spectrul și ponderea aberațiunilor cromozomiale în celulele meristemice la *Allium cepa* L., induse prin expunerea la plăcile acoperite cu nanocompozite bazate pe oxizii vanadiului**

Varianta experimentală	Nr. celule în mitoză analizate	Anomalii în celule mitotice						Nr. celule în interfază analizate	Nr. MN	Total, %
		CM	Mdf	Adf	P (A-T)	Fr	Total, %			
Martor	390	5	3	7	-	-	3,85	3021	5	0,17
48 h	283	6	2	6	2	3	6,71	1967	12	0,63
72 h	308	8	3	15	3	3	10,39	2396	51	2,13

CM – C-mitoză; Mdf – dereglări de fus în metafază; Adf – dereglări de fus în anafază; P (A-T) – punți ana-telofazice; Fr – fragmente de cromozomi; MN – micronuclee.

Creșterea ponderii de aberațiuni cromozomiale în variantele experimentale este însoțită de creșterea frecvenței micronucleelor (a se vedea Tabelul). În cazul expunerii la PNCOV rata micronucleelor crește considerabil de la 0,17% (în cazul martorului) la 0,61% și 2,13% (în cazul variantelor experimentale). Micronucleele (MN) se disting drept structuri cromatinice cu distribuție în apropierea nemijlocită a nucleelor sau în citoplasmă, dimensiunile cărora pot varia mult. Acestea au fost identificate în interfază (Fig.3 (c); Fig.4 (c)), dar și în unele faze ale diviziunii celulare (Fig.3 (b, c, f<sub>4</sub>); Fig.4 (b, c, f<sub>5</sub>)).

Micronucleele reprezintă corpi cromatinici extranucleari rezultați în urma rupturilor cromozomiale sau aneuploidiei [15,16]. Prezența micronucleelor se consideră a fi un indice al instabilității genomului, iar testul micronucleelor este utilizat pe larg în aprecierea leziunilor ADN și a genotoxicității diferitor agenți [17-19]. Analiza micronucleelor permite, de asemenea, investigarea mecanismelor de acțiune a diferitor agenți. Conform lui Leme și colab. [4], mărimea MN poate fi un parametru eficient pentru a evalua efectele clastogene și aneugene la *A. cepa* L., deoarece această specie prezintă un cariotip simetric, omogen în raport cu dimensiunea și numărul cromozomilor (mari și puțini) ( $2n = 16$ ). Prin urmare, MN mari ar indica un efect aneugenic, rezultat din pierderea cromozomilor, în timp ce MN mici pot indica o acțiune clastogenă, care rezultă din fragmente de cromozomi.

### Concluzii

Analiza citologică a dividerilor mitotice în rădăcinile de ceapă, obținute prin germinarea semințelor expuse la plăcile acoperite cu nanocompozite bazate pe oxizii vanadiului (PNCOV), a constatat implicarea acestora în inducerea mitozelor anormale ce au la bază dereglări ale fusului de diviziune. Acest fapt denotă caracterul citotoxic și genotoxic al plăcilor studiate. Inducerea aberațiunilor cromozomiale în ana-telofază și formarea micronucleelor în interfază confirmă potențialul clastogen și aneugen al PNCOV. Capacitatea PNCOV de a provoca instabilitate genomică poate fi un factor care predispune la carcinogenază. În acest context, devine esențială monitorizarea și caracterizarea ulterioară a toxicității lor sistemice, a genotoxicității și a carcinogenității.

### Referințe:

1. ИВАНОВ, В. Пролиферация клеток в растениях. Итоги науки и техники. В: *Цитология*, 1987, №5, с.216.
2. ДМИТРИЕВА, С., МИНИБАЕВА, Ф., ГОРДОН, Л. Митотический индекс меристематических клеток и рост корней гороха *Pisum sativum* при действии модуляторов инозитольного цикла. В: *Цитология*, 2006, Т.48, №6, с.475-479.
3. FISKEŠIO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. In: *J. Hereditum*, 1985, no.102, p.99-112.

4. LEME, D., MARIN-MORALES, M. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. In: *Mutation Research*, 2009, vol.682, p.71-81.
5. TEDESCO, S., LAUGHINGHOUSE, H. Bioindicator of contamination: the *Allium cepa* test. In: *Environmental contamination by Srivastava J. In: Tech*, 2012, p.137-156.
6. CHEN, X., SCHLUESENER, H.J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. In: *Toxicol. Lett.*, 2008, no.176, p.1-12.
7. NOWACK, B. and BUCHELI, T. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. In: *Environmental Pollution*, 2007, vol.150, no1, p.5-22.
8. CHENG-TENG, Ng., JASMINE, J.Li, BOON-HUAT Bay and LIN-YUE Lanry. Yung Current Studies into the Genotoxic Effects of Nanomaterials. *Journal of Nucleic Acids*, 2010. Article ID 947859, 12 pages, doi:10.4061/2010/947859 (<https://www.hindawi.com/journals/jna/2010/947859/>).
9. Environmental applications and impacts of nanotechnology: summary of evidence presented to nanotechnology working group. In: *The Royal Society and the Royal Academy of Engineering*, 2003.
10. PRILEPOV, V., GASIN, P., CIRITA, A., MIDONI, V., SPOIALA, D., KETRUSH, P. Technology of vanadium and its oxides based nanocomposite structures. In: *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 2014, vol.16, no1-2, p.232-236.
11. ДОСПЕХОВ, Б. *Методика полевого опыта*. Москва, 1985. 351 с.
12. БАЛОДИС, В. Некоторые закономерности роста и деления клеток в апикальной меристеме корня. В: *Цитология*, 1991, Т.4, с.50-58.
13. EL-GHAMERY, A., EL-NAHAS, A., MANSOUR, M. The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *A.cepae* and *V.faba*. In: *Cytologia*, 2000, vol.65, p.277-287.
14. GOUJON, E., RICHARD, C., GOUPIL, P., LEDOIGT, G. Cytotoxicity on *Allium cepa* of the two main sulcotriene photoproducts, xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulphonyl and 2-chloro-4-mesybenzoic acid. In: *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2015 (<https://www.elsevier.com/locate/pest>).
15. ИЛЬИНСКИХ, Н. *Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность*. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1992, 269 с.
16. MALUSZYNKA, J., JUCHIMIUK, J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. In: *Arch. Hig. Rada Toksikol.*, 2005, vol.56, p.177-184.
17. TERRADAS, M., MARTIN, M., TUSELL, L., GENESCA, A. DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response. In: *DNA Repair (Amst.)*, 2009, vol.8, p.1225-1234.
18. LAL, A., AMES, B. Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status. In: *Mutagenesis*, 2011, vol. 26, p.57-62.
19. LUZHNA, L., KATHIRIA, P., KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. In: *Frontiers in genetics*, 2013, vol.4, p.1-17.

**Date despre autori:**

**Maria FRUNZĂ**, doctor în biologie, conferențiar universitar, Facultatea de Biologie și Pedologie, Universitatea de Stat din Moldova.

**E-mail:** frunzamar@gmail.com

**ORCID:** 0000-0003-3668-956X

**Ana BÎRSAN**, doctor în biologie, conferențiar universitar, Facultatea de Biologie și Pedologie, Universitatea de Stat din Moldova.

**E-mail:** birsanana@mail.ru

**ORCID:** 0000-0003-1696-080X

Prezentat la 26.03.2021