

ABERAȚII CROMOSOMIALE MITOTICE INDUSE PRIN TRATAMENTUL CU ACETAT DE PLUMB LA SPECIILE *LARIX DECIDUA* L. ȘI *PICEA ABIES* L. APARTINÂND FAMILIEI PINACEAE

Laura BUBURUZAN

Universitatea Alexandru Ioan Cuza,
Facultatea de Biologie, Iași
telefon: +40232201072

The lead acetate is a powerful mutagen agent that determines the appearance of cells with chromosomal aberrations in plants and also in animals. It has been studied the influence of this substance on the germinated seeds belonging to two species: Larix decidua and Picea abies from the family Pinaceae. The research pursued the evaluation of the mitotic index, the frequency of the cells with chromosomal aberrations comparatively with the cells without genetical mutations, that followed to the treatment with the mutagenic agent in three different concentrations: 0.1, 0.2 and 0.3%. The time of exposure of the seeds to the influence of the lead acetate was 12 hours, 24 and 48 hours for each of the three concentrations. The evolution of the mitotic index for the species Picea abies is homogeneous, the concentrations of 0.1 and 0.2% of lead acetate determined the increase of the mitotic index and the 0.3% concentration decreased this value. In the case of Larix decidua species, it couldn't be established a pattern of evolution of the mitotic index referring to the concentration of the mutagen agent. Regardless of the concentration of the lead acetate, the exposure time of the seeds to the action of the mutagen agent and the species that has been used, it has been observed that the prophase is the dominant phase of the mitotic division, followed in the most of the cases by metaphase. The frequency of the cells with chromosomal aberrations is different at the two monitored species. The larch tree proved to be more tolerant to the action of the mutagen agent than the spruce fir. The frequency of the aberrations cells at larch tree is between 0.21-3.55% comparatively with the spruce fir where the range of frequency is between 0.30-4.89%. The most encountered types of chromosomal aberrations are the bridges, the retardatory chromosomes, the expelled chromosomes, the fragments, the multipolar A-T and the micronuclei.

Keywords: *Larix decidua, Picea abies, lead acetate, chromosomal aberrations, mutation.*

Orice substanță chimică neobișnuită care intră în corpul uman prin intermediul sistemului digestiv sau respirator, este considerată un potențial agent mutagen. Experimentele cu astfel de mutagene la om nu se realizează, ele determinând avort spontan, naștere de copii morți și malformații congenitale la

populația expusă la substanțele nocive. Diferitele asocieri nu pot furniza decât informații indirecte cu privire la nocivitatea acestor compuși.

Este mult mai simplu și sigur să se procedeze la expunerea organismelor experimentale (plante sau animale) sau a culturilor de celule la acțiunea substanțelor suspectate ca posibile mutagene și să se observe rezultatele.

Ne-am propus evaluarea efectului mutagen pe care-l are acetatul de plumb, sare a unui metal greu, care este deosebit de toxic și frecvent întâlnit în natură, determinând poluarea mediului înconjurător, intoxicarea vegetației, faunei și a omului.

Prin studiul efectului acetatului de plumb asupra indivizilor de molid [*Picea excelsa* (Lam.) Link] și de larice (*Larix decidua* L.), două specii atât de frecvente și totuși atât de puțin studiate la noi, din punct de vedere genetic, se poate extrapola acest efect negativ și asupra omului.

Cunoscându-se modul în care acționează acest compus se va privi cu mai multă seriozitate, dându-se mai multă importanță aspectului ecologic al acestei probleme.

MATERIAL ȘI METODĂ

Drept material biologic s-au utilizat semințe germinabile de *Picea abies* și *Larix decidua* procurate de la Direcția Silvică Suceava. S-au utilizat soluții de acetat de plumb $[\text{CH}_3\text{COO}]_2\text{Pb}$ în concentrație de 0,1%; 0,2%; 0,3%. Acestea s-au obținut prin dizolvarea acetatului de plumb cristalin în apă distilată, în diferite proporții.

Semințele au fost puse la germinat la temperatura camerei în cutii Petri cu hartie de filtru îmbibată în apă distilată. Pe măsura gerimării semințelor, când rădăcinițele au ajuns la dimensiunea de 10-15 mm, cele aparținând matorului au fost recoltate iar celelalte au fost așezate pe noi cutii Petri cu hartie de filtru îmbibate în acetat de plumb de concentrații diferite unde au fost păstrate timp de 12, 24, respectiv 48 ore.

După tratamentul cu agent mutagen, semințele germinate au fost introduse în soluție fixatoare (alcool etilic absolut / acid acetic glacial 3:1) pentru 24 ore. Apoi semințele au fost conservate la frigider, în alcool etilic 70%. Apoi acestea au fost spălate cu HCl 1 N, timp de 5 minute, la temperatura camerei. Pentru hidroliză s-a folosit HCl 50% timp de 18-19 minute, la temperatura camerei. Colorarea s-a realizat cu colorant Carr la frigider timp de 24 ore. Lamele pentru citirea la microscop au fost realizate conform protocolului squash, citirea microscopică s-a realizat la 20x, iar fotografiile au fost realizate în imersie la 100x.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

1. *Picea abies*

a) Indicele mitotic (IM)

La aplicarea unui tratament cu acetat de plumb 0,1% se observă o variație inexplicabilă a indicelui mitotic. La 12 ore de tratament acesta este de 0,32, crește la 24 ore de tratament până la 0,38 și apoi scade după 48 ore la 0,30. În cazul tratamentului cu acetat de plumb 0,2% și 0,3% odată cu creșterea timpului de acțiune a agentului mutagen se produce o reducere a indicelui mitotic. Acest lucru

demonstrează prezența unui număr din ce în ce mai mic de diviziuni celulare, invers proporțional cu timpul de expunere.

Deosebit de interesant este faptul că sub impactul acetatului de plumb în concentrații mici (0,1% și 0,2%) se constată a creștere a indicelui mitotic la toți timpii de tratament (12 ore, 24 ore, 48 ore). La doza de 0,3%, indicele mitotic se apropie de cel înregistrat la martor (0,23%).

b) Frecvența fazelor diviziunii mitotice

În ceea ce privește fazele diviziunii se observă o scădere a procentului profazelor din celulele în diviziune odată cu creșterea concentrației acetatului de plumb concomitent cu creșterea procentului celorlalte faze ale diviziunii (metafază, anafază și telofaza), pentru timpul de acțiune 48 ore. Astfel, dacă s-au identificat 87,1% profaze la concentrația acetatului de plumb de 0,1%, la concentrația 0,2% există 86,8% profaze iar la concentrația 0,3% a acetatului de plumb, 80,2%. Concomitent, am întâlnit 5,9% M; 4,3% A; 2,8% T la concentrația 0,1% a acetatului de plumb; 6,0% M; 4,6% A; 2,6% T la concentrația de 0,2% și 8,3% M; 5,0% A și 6,5% T la concentrația mai mare a agentului mutagen.

c) Frecvența celulelor cu aberații

Comparând rezultatele obținute prin tratamentul indivizilor de *Picea excelsa* cu acetat de plumb în concentrații diferite (0,1%, 0,2%, 0,3%) se observă că cel mai previzibil comportament a fost în cazul tratamentului cu acetat de plumb în concentrație de 0,1% (fig. 1). În acest caz, frecvența aberațiilor a crescut odată cu creșterea timpului de expunere a indivizilor la acțiunea agentului mutagen (0,47% pentru timpul de 12 ore; 0,50% pentru 24 ore și 0,76% la un timp de 48 ore). În cazul celorlalte două tratamente (cu acetat de plumb concentrație 0,2% și 0,3%) se observă un comportament inexplicabil al indivizilor.

Indivizii cel mai puternic afectați au fost cei supuși tratamentului cu acetat de plumb în concentrație de 0,2%, timp de 48 ore, aceștia înregistrând o frecvență a celulelor cu aberații cromosomiale de 1,37% (fig. 2).

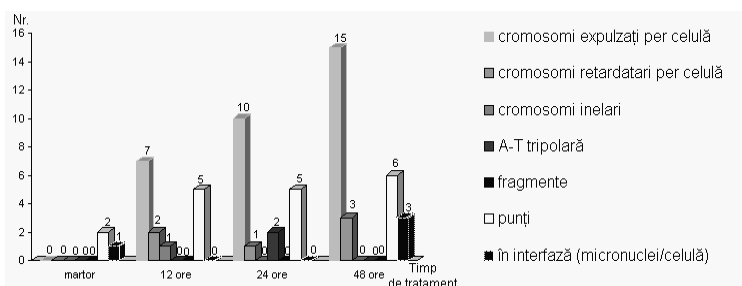


Figura 1 Numărul și tipul aberațiilor de diviziune induse prin tratamentul cu acetat de plumb, 0,1% administrat pe perioade diferite de timp, la indivizi ai speciei *Picea abies*

Principalele tipuri de aberații cromosomale întâlnite sunt: cromosomii expulzați, punțile, cromosomii retardatari, fragmentele, A-T multipolare și micronucleii.

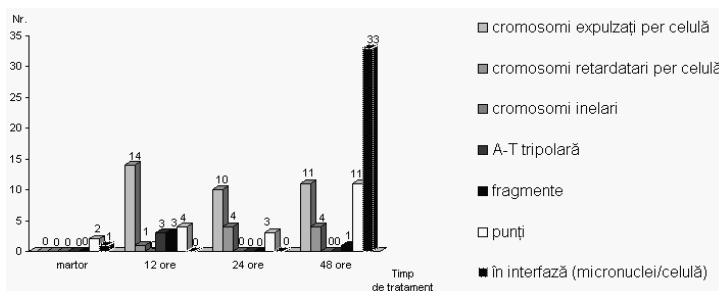


Figura 2 Numărul și tipul aberațiilor de diviziune induse prin tratamentul cu acetat de plumb, 0,2% administrat pe perioade diferite de timp, la indivizi ai speciei *Picea abies*

2. *Larix decidua*

a) Indicele mitotic (IM)

În cazul aplicării tratamentelor cu acetat de plumb la concentrație 0,1% și 0,3% s-au obținut valori apropiate ale indicelui mitotic de cele din cazul martorului (0,24). La concentrație 0,1% a acetatului de plumb, după 24 ore de tratament, indicele mitotic rămâne aproape neschimbat (0,23), apoi după 24 ore și 48 ore acesta suferă o ușoară creștere față de normal (0,29, respectiv 0,28). Aceasta dovedește a stimulare a diviziunilor celulare de către acetatul de plumb în concentrație mică. În cazul concentrației 0,3% a acetatului de plumb, după 12 ore, se înregistrează a creștere mare a indicelui mitotic până la 0,37, dar acesta scade pe măsură ce contactul cu agentul mutagen se prelungește, devenind 0,23 pentru 24 ore de tratament și 0,21 pentru 48 ore de tratament.

La o concentrație de 0,2% a acetatului de plumb pentru perioadele de 12 ore și 24 ore de acțiune se observă o creștere a indicelui mitotic față de martor, acesta având valorile 0,33 respectiv 0,34. După o perioadă de 48 ore, indicele mitotic scade brusc, înregistrând cea mai mică valoare pentru indivizii speciei *Larix decidua* și anume 0,19.

b) Frecvența fazelor diviziunii mitotice

În cazul indivizilor de larice cel mai mare procent al profazelor a fost înregistrat la tratamentul cu soluție de acetat de plumb 0,3%, timp de 12 ore (91,3%), valorile procentuale cele mai mici fiind înregistrate pentru concentrația 0,2% a acetatului de plumb (85,8% - timpul de 12 ore; 87,9% - timpul de 24 ore și 77,7% - timpul de 48 ore).

Valorile celorlalte faze ale diviziunii fluctuează invers proporțional cu cele ale profazelor. Astfel, creșterea procentului profazelor în diferite tipuri de tratamente determină o scădere procentuală a M, A, T și invers.

c) Frecvența celulelor cu aberații

Comparând indivizii speciei *Larix decidua* tratați cu acetat de plumb în concentrații diferite (0,1%; 0,2%; 0,3%) se observă că cel mai omogen comportament a fost în cazul tratamentului cu acetat de plumb în concentrație de 0,1%. În acest caz, diferența dintre procentul celulelor cu aberații cromosomiale

fiind foarte mică în compararea rezultatelor expunerii timp de 12 ore, 24 ore și 48 ore (0,21%; 0,19%; 0,16%).

Cel mai puțin afectați au fost indivizii expuși unui tratament cu acetat de plumb în concentrație de 0,1%, timp de 48 ore, identificându-se în acest caz doar un procent de 0,16% celule cu aberații cromosomiale.

Cel mai puternic afectați de tratamentul cu agent mutagen au fost indivizii ce s-au dezvoltat timp de 48 ore într-o soluție de acetat de plumb 0,2%. Aceștia prezintă a medie a frecvenței celulelor aberante de 0,61% (fig. 3).

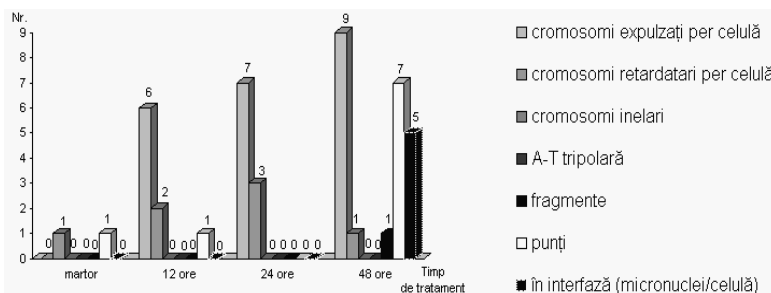


Figura 3. Numărul și tipul aberațiilor de diviziune induse prin tratamentul cu acetat de plumb, 0,2% administrat pe perioade diferite de timp, la indivizi ai speciei *Larix decidua*

În ceea ce privește numărul și tipul aberațiilor, cromosomii expulzați sunt singurii care apar în cazul tuturor dozelor de acetat de plumb și la toți timpii de expunere, frecvența cea mai mare după aceștia având-o punțile (fig.4 a, b).

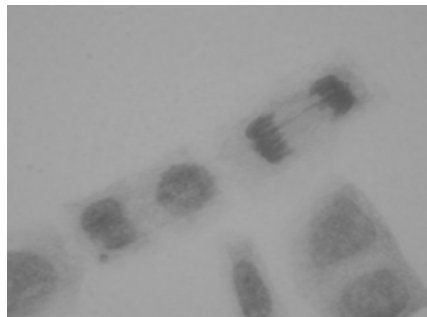
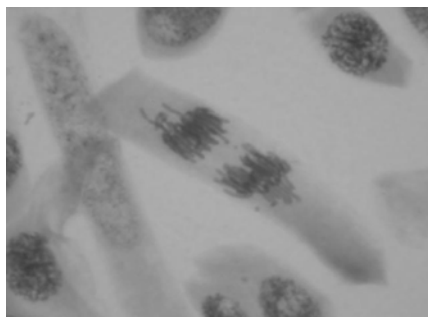


Figura 4. Anafază cu cromosomi expulzați (a) și telofaze cu punte și micronucleu (b)

CONCLUZII

Acetatul de plumb este un compus toxic care a acționat asupra indivizilor de *Picea abies* și *Larix decidua* ca agent mutagen, determinând apariția de celule cu aberații cromosomiale și în același timp influențând frecvența diviziunilor celulare și raportul dintre frecvența fazelor de diviziune.

În urma efectuării investigațiilor s-a observat că frecvența celulelor cu aberații se încadrează procentual între 0,30% și 1,37% în cazul molidului și este

doar 0,16% până la 0,61% la larice. În concluzie, se poate constata că specia cea mai afectată, deci și cea mai sensibilă este *Picea abies*.

Acest agent mutagen a fost cel mai puternic în concentrație de 0,2% la un timp de tratament de 48 ore, în acest caz producând cea mai mare cantitate de celule cu aberații cromosomiale raportată la totalul celulelor numărate și anume 1,37% în cazul molidului și 0,61 % pentru larice.

S-a constatat că acetatul de plumb are, în general, un efect stimulator asupra diviziunilor celulare fapt ce se observă și din valorile obținute pentru indicele mitotic.

În ceea ce privește fazele diviziunii, profaza prezintă cel mai ridicat procent, iar fluctuația procentuală a profazei într-un sens sau altul determină fluctuația în sens invers a procentelor celorlalte faze ale diviziunii.

BIBLIOGRAFIE

1. Ekberg, I., Eriksson, G., 1966 - *Development and fertility of pollen in three species of Larix*, Department of Forest Genetics, Royal College of Forestry, Stockholm 50, Sweden.
2. Fărtăiș, L., 2002 - *Genetică și ameliorarea speciilor forestiere*, Editura Universității, Suceava, p. 21 – 28.
3. Greifhuber, J., 1986 - *Severly distorted Feulgen – DNA amounts in Pinus (Coniferophytina) after nonadditive fixations as a result of meristematic self-tanning with vacuole contents*, Institute of Botany, University of Vienne, Austria.
4. Raicu., P., Stoian, Veronica, Nicolaescu, Măriuca, 1974 - *Mutațiile și evoluția*, Editura Orizonturi, București, p. 44 – 82.
5. Smustad., P., Simmons, J., M., Jenkins, B., J., 1997 - *Principles of Genetics*, John Willey&Sons, In., Canada.
6. Starr, Cecie, 1991 - *Biology: Concepts and Applications*, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California.