

EFECTE CITOGENETICE ȘI BIOCHIMICE INDUSE DE TRATAMENTUL CU ACID ASCORBIC ȘI ACID CITRIC LA *THUJA ORIENTALIS* L.

**Ioana-Anca IEREMIE,
I.I. BĂRA, V. ARTENIE**

¹Universitatea „Al. I. Cuza”, Iași
e-mail: ancatari@yahoo.com, soveja@uaic.ro

Choosing this species as the investigation material is motivated by a small number of existed studies, and the dates that will be obtained can be used to improve plants. The investigation of cell division is a permanently preoccupation, this process having a major importance in development of the individual biological systems. In this approach we propose to analyse by citogenetic and biochemic way, Thuja orientalis L. from Cupressaceae family. Thus, we treated Thuja orientalis L. seeds with solutions of ascorbic acid (E300) and citric acid (E330) in three different concentrations: 0.1 %, 0.25 % and 0.5 %. The results we obtained were colligated with the etalon. We observed the stimulator or inhibitor effect of ascorbic acid and citric acid to the mitotic division and estimated the aberrations appearance. After calculation, we observed that citric acid has a strong effect to the roots of Thuja orientalis L. establishing the increase of aberrations in cells. Between aberrations, the simples and multiples bridges are predominant. This explained that the used substances blocked the migrations of chromosomes to the poles of the division axle. The small number of aberrant ana-telophases after the treatment with ascorbic acid can be determinated by a strong antioxidant effect of this substances. The mitotic index increases at seeds treated with citric acid, which indicates that this substance stimulates the cells division. The biochemical investigations was based on the estimation of respiration enzymes activity (superoxid dismutase, peroxidase and catalase). The enzymes activity is inhibited by high concentrations, comparative the etalon. Behind the biochemical analyses, we observed that superoxid dismutase(SOD) and catalase are inhibited of high concentrations. By other way, the peroxidase activity is stimulate at both treatments. In conclusion, this two substances has influence to the reactive species of oxygen and this reflect the cell stress state.

Keywords: *semințe de Thuja orientalis L., mitoza, aberații, enzime antioxidante.*

Când am ales acidul ascorbic (vitamina C) și acidul citric pentru realizarea experimentelor, ne-am gândit și la faptul că sunt aditivi alimentari. Aditivii alimentari sunt substanțe adăugate alimentelor pentru a le îmbunătăți sau păstra unele funcții tehnologice cum ar fi culoarea sau gustul. Acești aditivi sunt adăugați în cantități considerate sigure pentru sănătate. O mare parte sunt însă toxici.

Hiperaciditatea la copii, alergiile, astmul, migrenele sunt adesea asociate cu reacții adverse la aceste substanțe. Din acest motiv considerăm oportune studiile noastre în acest sens.

În această lucrare ne-am propus să urmărim din punct de vedere citogenetic și biochimic efectele acidului ascorbic și acidului citric în germinația semințelor de *Thuja orientalis* L. Studii citogenetice asemănătoare, am găsit în literatură la *Secale cereale* care a fost tratată cu tartrazină (E102), azorubina E(122), albastru alimentară E(131), verde brilliant E (142).

MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul biologic utilizat în acest experiment este reprezentat de semințe de *Thuja orientalis* L. culese din Grădina Botanică din Iași (2006).

Semințele au fost puse la geminat în condiții de laborator, în cutii Petri la termostat, la temperatura de 24-25 °C. Germinarea s-a realizat în prezență de acid ascorbic sau acid citric până ce rădăcinile au ajuns la 10-15 mm lungime.

Substanțe utilizate: acid ascorbic (E 300) și acid citric (E 330) cu concentrații de 0.1%, 0.25% și 0.5%. De asemenea am folosit și o variantă martor în care semințele au fost germinate în apă distilată.

Protocol pentru analizele citogenetice

După germinare rădăcinile au fost imersate în fixator (soluție de 3 părți alcool etilic absolut : 1 parte acid acetic glacial) pentru 24 de ore, apoi trecute în alcool etilic 70% pentru păstrare. Pentru investigațiile citogenetice s-a realizat o hidroliză cu HCl 1N (5 minute), apoi cu HCl 50 % pentru 6 minute. Colorarea s-a făcut cu reactiv Carr pentru 24 de ore. Meristemele radiculare au fost dispersate prin metoda squash [Cîmpeanu et al., 2002].

Observațiile microscopice s-au realizat la microscopul Novex K-Range, iar microfotografiile au fost executate cu camera digitală Canon.

Protocol pentru analizele biochimice

Pentru evidențierea activității enzimelor antioxidante, superoxid dismutaza, peroxidaza și catalaza am realizat o serie de analize biochimice. Am urmărit acțiunea stimulativă sau inhibitorie pe care o exercită acidul ascorbic și acidul citric asupra acestor enzime și impactul la nivel celular. Pentru exactitate, la fiecare din concentrațiile utilizate am realizat trei probe (variante). Am obținut un extract enzimatic prin mojararea materialului vegetal și extragerea cu soluție 0,1 M de fosfat disodic. Probele astfel realizate au fost supuse centrifugării la 3000 de rotații pe minut timp de 15 minute. În supernatantul obținut am dozat cele 3 enzime conform protocolului de lucru.

Activitatea catalazei s-a determinat prin metoda titrimetrică cu tiosulfat de sodiu [Artenie, Tănase, 1981]. Ca unitate catalazică s-a considerat acea cantitate de enzimă care descompune un micromol de apă oxigenată per minut.

Activitatea superoxid dismutazei a fost determinată utilizând metoda Winterbourn, Hawkins, Brian și Carrell [Iordăchescu, Dumitru, 1988], care se bazează pe inhibarea reducerii NBT de către anionul superoxid produs prin fotoreducerea riboflavinei. O unitate de SOD s-a definit ca fiind acea cantitate de enzimă care produce o inhibiție de 50%.

Activitatea peroxidazei s-a estimat prin metoda spectrofotometrică cu o-dianisidină [Gudkova, Degteari, 1968]. Activitatea peroxidazei se exprimă în unități enzimatic, adică în micromoli de apă oxigenată descopușă într-un minut.

Datele experimentale obținute au fost prelucrate statistic după testul Student [Văleanu, Hâncu, 1990].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În urma examinării preparatelor microscopice și a efectuării analizelor biochimice am obținut o serie de date pe care le-am comparat cu proba martor. Între datele de citogenetică și cele biochimice vom încerca să găsim corelații între acțiunea acidului ascorbic și acidului citric asupra IM (indice mitotic), frecvenței de apariție a mutațiilor și asupra enzimelor antioxidante: catalaza, superoxid dismutaza (SOD) și peroxidaza.

Interpretarea statistică a datelor biochimice ne-a permis o precizie mai mare la corelarea rezultatelor.

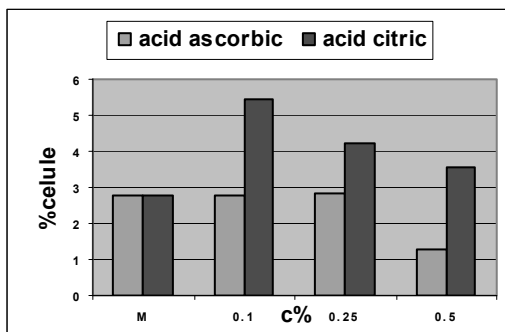


Figura 1. **Dinamica comparativă a IM la *Thuja orientalis* L. sub influența tratamentului cu acid ascorbic și acid citric**

În ce privește indicele mitotic, se observă o creștere a acestuia la concentrația de 0.1% la ambele tipuri de tratament. Numărul de celule în diviziune a fost stimulat vizibil la tratamentul cu acid citric comparativ cu martorul și tratamentul cu acid ascorbic (fig. 1) [Băra, 2003].

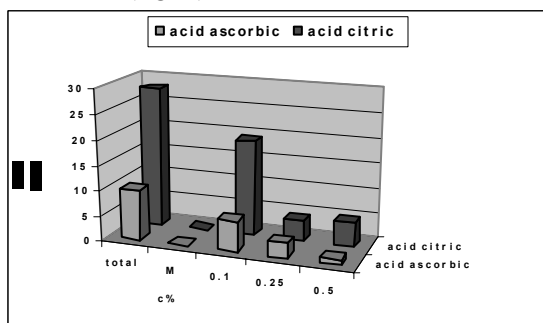


Figura 2. **Frecvența aberațiilor de diviziune la *Thuja orientalis* L. sub influența tratamentului cu acid ascorbic și acid citric**

Ca și indicele mitotic, concentrația de 0.1% acid citric a stimulat rata de apariție a mutațiilor. De asemenea, observăm că frecvența aberațiilor scade cu creșterea concentrației agentului mutagen [Băra, 1996]. Aceasta ar putea fi explicat prin efectul antioxidant al acestor substanțe (fig. 2). Dintre aberații predomină punțile simple și multiple, iar într-un procent mai scăzut de ana-telofaze (A-T) cu cromosomi expulzați (fig. 3, fig. 4).

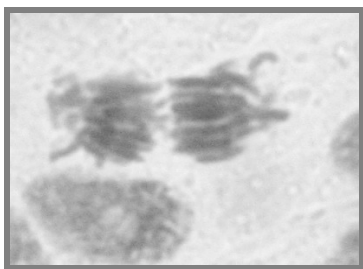


Figura 3. *Thuja orientalis* L., 0.25% acid ascorbic A-T cu punți și cromosomi expulzați

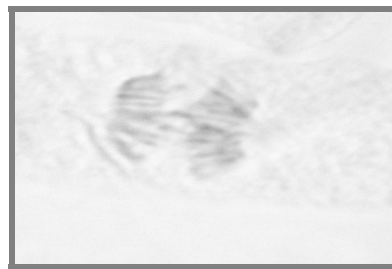


Figura 4. *Thuja orientalis* L., 0.1% acid citric A-T punte dublă

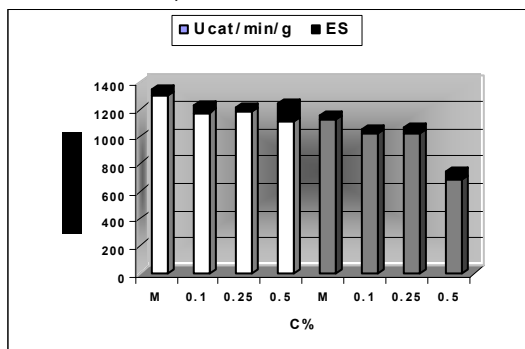


Figura 5. Activitatea catalazei în semințele de *Thuja orientalis* L. germinate în acid ascorbic (coloane albe) și respectiv acid citric (coloane gri)

Activitatea catalazei este inhibată la ambele tipuri de tratament, dar semnificativ la concentrația de 0.5 % a acidului citric. La acidul ascorbic variațiile sunt destul de mici (fig. 5).

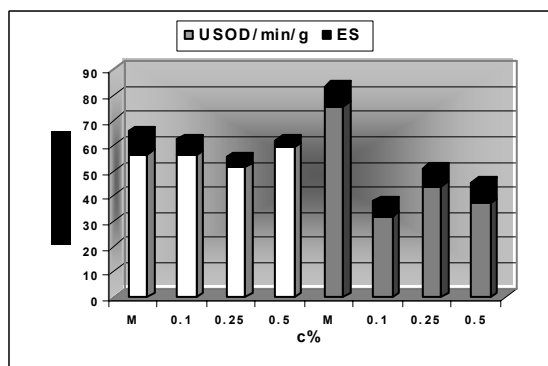


Figura 6. Activitatea SOD în semințele de *Thuja orientalis* L. germinate în acid ascorbic (coloane albe) și respectiv acid citric (coloane gri)

Activitatea SOD prezintă de asemenea o inhibare la ambele tipuri de tratament și în special la concentrația de 0.25 % a acidului ascorbic și 0.1 % a acidului citric (fig. 6).

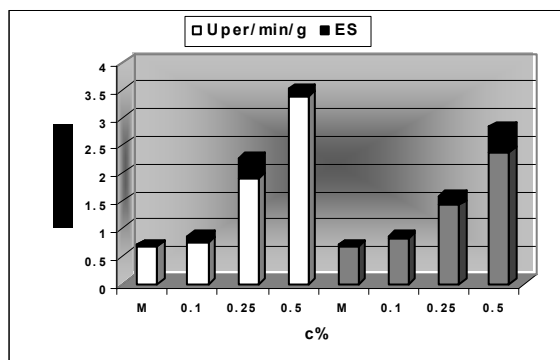


Figura 7. Activitatea peroxidazei în semințele de *Thuja orientalis* L. germinate în acid ascorbic (coloane albe) și respectiv acid citric (coloane gri)

Activitatea peroxidazei este stimulată semnificativ de ambele tipuri de tratament aplicate după cum se observă și în figura 7. Acest fapt poate dovedi că în celulă are loc un ușor stres oxidativ cu formare de specii reactive de oxigen, în special apă oxigenată (H_2O_2), care constituie unul din substratele peroxidazei.

CONCLUZII

Indicele mitotic crește la ambele tipuri de tratament comparativ cu martorul, excepție făcând doar acidul ascorbic la concentrația de 0.5 %.

Frecvența aberațiilor de diviziune este stimulată de concentrația de 0.1 %, comparativ cu martorul și celelalte 2 concentrații utilizate. Dintre aberații, cea mai mare pondere o au punțile simple și multiple, aceste substanțe determinând blocarea migrării cromosomilor spre polii fusului de diviziune.

Activitatea catalazei este inhibată la ambele tipuri de tratament, în special de acțiunea acidului citric.

Activitatea superoxid dismutazei în semințele de *Thuja orientalis* L. este de asemenea inhibată de către ambele substanțe utilizate (acid ascorbic și acid citric).

Atât acidul citric cât și acidul ascorbic stimulează activitatea peroxidazei, cele mai mari valori înregistrându-se la concentrația de 0.5 %.

Concentrația de 0.1 % a acidului citric determină creșterea valorilor indicelui mitotic, a procentului de ana-telofaze aberante și activității peroxidazei. Catalaza și superoxid dismutaza sunt ușor inhibate de această substanță, la această concentrație.

BIBLIOGRAFIE

1. Artenie Vlad, Tănase Elvira, 1981 – *Practicum de biochimie generală*, Centrul de Multiplicare al Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Iași, p.135.
2. Băra I.Ion, 1996 – *Vademecum în genetică*, Editura Corson, Iași, p. 50-52.
3. Băra I.Ion, Mirela M. Cîmpeanu, 2003 – *Genetica*, Editura Corson, Iași, p.59-74.
4. Cîmpeanu Mirela, Maniu Marinela, Surugiu Iulia, 2002 - *Genetica – metode de studiu*, Editura Corson, Iași.

5. Gudkova L.V., Degtiari R.G., 1968 – *Metod opredelenija aktivnosti peroxidazî*. În kn.: Fermentî v mediține, pișcevoi promișlennosti i v sel 'skom hoziastve. „Naukova dumka”, Kiev, p. 152
6. Ieremie Ioana-Anca, Mihaela Bălan, Ion I. Băra, 2007 – *Citogenetics effects induced by the administration of substances with reduction potential at Larix decidua Mill. ssp. carpatica (Dom.), Picea abies (L.) Karst. and Thuja orientalis L.*, Editura Universității „Al.I.Cuza”, Analele Științifice, Tom VIII, Fasc.1, p.199-206.
6. Iordăchescu Dana, Dumitru I.f., 1988 – *Biochimie practică*, Ediția a 2-a : Revăzută și Completată, Universitatea din București, p.133.
7. Văleanu I., Hâncu M., 1990 – *Elemente de statistică generală*, Editura Litera, București, p.25, 74.