

INSTITUT ZA POVRTARSTVO — SMEDEREVSKA PALANKA

Vladimir Spasojević
R. E. Webb

Citogenetički efekat etilmetansulfonata u paprike

Sadržaj: Uvod. — Materijal i metodi. — Rezultati. — Diskusija. — Literatura.
— *Summary.*

Uvod

Etilmetansulfonat (EMS) je jedan od najviše studiranih savremenih hemijskih mutagena. Zahvaljujući njegovoj visokoj mutagenoj efektivnosti, ovaj alkilirajući agens je postao vrlo značajan za mutacioni metod oplemenjivanja biljaka. Kad se upotrebi adekvatna procedura, EMS je sposoban da indukuje različite mutacione tipove s visokim procentom nadživljavanja. Ovo oplemenjivaču pruža velike mogućnosti za proizvodnju vrlo polimorfnih mutantnih populacija.

Izvesno vreme se mislilo da EMS deluje isključivo na molekularnom nivou, indukujući samo genske mutacije, većinom hlorofilnog tipa^{1,2,3,4}. Veliki broj radova je zatim objavljen i u njima se dokazivalo da ovaj agens indukuje i hromozomne mutacije i da je centromerni region hromozoma specijalno osetljiv na dejstvo ovog faktora^{4,5,6,7}. Većina recentnih ispitivanja pokazuje da je citološki efekat EMS prilično ograničen i specifičan, rezultirajući pretežno u centromerna oštećenja, izo- i pseudoizohromozome⁶. Koliko nam je do sada poznato, nema stvarnih dokaza da je EMS sposoban da indukuje neke tipove hromozomnih mutacija kao što su inverzije, translokacije i poliploidija (sa izuzetkom slučajeva aneuploidije izazvane nerazdvajanjem centromera). Neki savremeni rezultati ispitivanja ne potvrđuju čak mišljenje da je EMS uopšte sposoban da indukuje hromozomne mutacije. Objašnjenja za ove diskrepance se, verovatno, nalaze u primeni tehnike i radnih metoda, ili, možda, u izboru eksperimentalnih objekata koji različito reaguju na EMS. Mada je osnovni zadatak našeg programa s paprikom bio rešavanje problema oplemenjivanja, učinilo nam se da saopštenje o ovom eksperimentu može pružiti korisnu informaciju o mutagenom dejstvu EMS.

Ovo ispitivanje je delom finansiralo Ministarstvo poljoprivrede SAD pod PL 480, Projekat E30—CR—27.

Materijal i metodi

Tretirali smo suvo seme (caryopses) paprike, sorte A1—12 sa 1%, 2% i 3% rastvorom etilmetansulfonata. U 1% rastvoru je seme bilo potopljeno 6, 8 i 12 časova a u 2% i 3% EMS 8 časova. Tri stotine semenki je bilo obrađeno u svakoj koncentraciji (kontrola u destilovanoj vodi). Mutagen je adjustiran na pH 7. Količina mutagena je odgovarala trostrukoj zapremini semena. Temperatura je održavana na 20°C. Posle tretmana seme je isprano i stavljeno da klija u Petrijevim posudama.

Citološka ispitivanja mejozisa izvršena su u nadživelim M₁-biljkama. Antere mladih pupoljaka su fiksirane u acetičnom alkoholu (smeša 1:3), a preparati su načinjeni kao acetokarminski skvečovi. Citološke studije su obuhvatile uglavnom prvu mejotičku deobu. Svi mikroskopski crteži su načinjeni pomoću kamera lucida (uvećanje 750 x).

Rezultati

Seme koje je bilo tretirano sa EMS i kontrole isprani su posle obrade i stavljani u čiste Petrijeve posude da kliju na temperaturi od 20°C. Ocenjivanje klijavosti je izvršeno tokom 7 dana od početka klijanja. Posle rasadivanja biljaka u lonce prikupljani su dalji podaci svakih 5 dana da bismo dobili obaveštenje o oblicima oštećenja, a naročito da bismo odredili procenat nadživljavanja M₁-biljaka. Podaci o ovim zapažanjima se vide u tab. 1.

Ovi podaci pokazuju prilično pravilan pad vitalnosti s povećanjem koncentracije i trajanjem tretmana.

Tab. 1. — Klijavost i nadživljavanje M₁-biljaka izraženi u % posle tretmana semena 1%, 2% i 3%

Germinability and Survival of M₁-plants Expressed in % after Treatment of Seeds with 1%, 2% and 3% EMS

| Tretman Treatment | Klijanje Germination | D nije uginulo Died later | Nadživelost Survived |
|-----------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 1. Kontrola — Control | 97,0 | 5,8 | 91,2 |
| 2. 1% EMS | | | |
| 6 časova — 6 hours | 84,0 | 11,8 | 72,2 |
| 8 časova — 8 hours | 81,7 | 22,9 | 58,8 |
| 12 časova — 12 hours | 81,7 | 29,4 | 52,3 |
| 3. 2% EMS | | | |
| 8 časova — 8 hours | 83,7 | 21,5 | 62,2 |
| 4. 3% EMS | | | |
| 8 časova — 8 hours | 61,7 | 37,0 | 24,7 |

Nadživljavanje je bilo, na primer, smanjeno za 20% kada je tretman sa 1% EMS bio produžen od 6 na 12 časova, dok je smanjenje nadživljavanja iznosilo 34% kad je koncentracija EMS bila povećana od 1 na 3% (u 8-časovnom tretmanu). Odstupanje se pojavljuje u tretmanu sa 2% EMS, gde je letalnost nešto niža nego u tretmanu sa 1% EMS. Ovo bi mogla biti posledica slučajne greške. Podaci u tab. 1 ne predstavljaju stvaran mutageni efekat zato što je letalnost u M₁-generaciji rezultat ne samo genetičkog oštećenja nego i toksičnosti, po čemu je EMS poznat, naročito u produženim tretmanima i na povećanim temperaturama. Mi nismo tačno odredili morfološka oštećenja, izuzev

što smo zabeležili njihove oblike. Zapazili smo da su najčešći različiti tipovi hlorofilnih oštećenja, ali se pojavljuju i deformacije lista i stabla, patuljavost i inhibicije porasta i razvića itd. Oštećenja su bila naročito česta kad je tretman produžen od 6 na 12 časova (1%), što sugeriše delimično toksičnu prirodu ovih oštećenja. Treba naglasiti da je mutageni efekat EMS određen citološkim analizama mejozisa nadživelih biljaka M_1 , ali treba, takođe, istaći da su hromozomne mutacije samo deo efekta: poznato je da su genske mutacije koje indukuje EMS značajnije.

Utvrđeno je da mikrosporogeneza u kontrole teče normalno. Haploidni broj hromozoma je $n = 12$. Univalenti se pojavljuju u dijakinezi s učestanošću od 2,2%, a u 2 ili 3 bivalenta hijazme se kompletno terminalizuju u jednom od krakova hromozomnih. Otuda nije neuobičajeno prisustvo 2—4 univalenta u metafaznoj ploči. Međutim, ovaj fenomen ranog razdvajanja, očigledno, nije ozbiljna aberacija, te je distribucija univalenata u anafazi I normalna. To znači da nije bilo »lagarda«.

Analizom preparata M_1 -biljaka odgajenih iz semena tretiranog 1%-im EMS u toku 8 časova, zapaženo je da se u oko 9% ćelica u metafazi I jedan bivalent nalazio izvan ploče. Ova neorijentacija bivalenta može biti indikacija male centromerne abnormalnosti. Međutim, ova aberacija je zapažena samo u mikrosporogenezi M_1 -biljaka ove grupe. Nikakve strukturne aberacije nisu više zapažene u anafazi I i telefozi I (sl. 1—5).

Slična su bila zapažanja i za biljke iz grupe 6-časovnog i 12-časovnog tretmana. U vezi s ovim rezultatima interesantno je da su naša ispitivanja u drugom jednom eksperimentu⁸ pokazala da hromozomi kukuruza ispoljavaju veću osetljivost prema istoj dozi EMS. Tretman sa 2% EMS, takođe, nije pokazao visoku efikasnost u pogledu indukcije strukturnih hromozomnih aberacija u paprike. Međutim, neorijentacija bivalenta za vreme metafaze I povećala se ovde na oko 13,3%, što dokazuje da je centromerni region vrlo osetljiv na dejstvo EMS. Pored toga smo zapazili oko 6,6% ćelica u anafazi I s hromatinskim sponama.

Znatne strukturne i konstitucione, mnogobrojne hromozomne aberacije indukovane su tek 3%-nom koncentracijom EMS. Pseudoizohromozomi u dijakinezi (sl. 2), prometafazi i metafazi (sl. 3—7) pojavili su se s učestalošću od oko 25%. Nađeno je oko 8% ćelica u metafazi I sa 2—6 univalenata (sl. 6), kao i 4,4% $4n$ mikrosporocita (48 hromozoma) (sl. 22). Jedan par hromozoma ispoljava tendenciju za prerano razdvajanje centromera (sl. 8—10) u oko 12% ćelica u anafazi I. Najzad, dicentrični s anafaznim hromatinskim sponama pojavili su se s frekvencijom od 9,26% u anafazi I (sl. 1—14, 16), kao i 0,93% s vezanim fragmentima. Ovo pokazuje da dicentrične sponne, verovatno, potiču od jednog submetacentričnog bivalenta kao rezultat razmene između suprotnih krakova jednog para homoloških hromozoma.

U telofazi I je 3,7% ćelica imalo 1—2 acentrična fragmenta ili izohromozoma (kao lagardi), a 0,6% telofaza je bilo sa sponama i vezanim fragmentima (sl. 18 i 19); zabeleženo je i 1,9% ćelica u poznoj telofazi I sa 1—4 mikronukleusa (sl. 20).

Neorijentisanost hromozoma takođe je zapažena u metafazi II (sl. 17). Oštećenja centromera i acentrični fragmenti su se pojavili kao lagardi i mikrojedra (1—3) s učestanošću oko 5% u telofazi II (sl. 21).

Diskusija

Na osnovu pregleda savremene naučne literature može se zaključiti da se eksperimentatori nisu uvek slagali u pogledu pitanja da li je EMS sposoban da indikuje hromozomne mutacije. U nekim eksperimentima ovaj snažni i veoma efektivni mutagen je indukovao samo genske mutacije, a u drugim, takođe, strukturne i konstitucione, brojne hromozomne mutacije. Poznato je da mutagena efikasnost EMS zavisi ne samo od koncentracije nego i od temperature, pH rastvora i trajanja tretmana. Otuda razlike u eksperimentalnim uslovima mogu ponekad biti uzrok različitim mišljenjima. Naš eksperimentat sugerise i drugu mogućnost; naime, različite vrste organizama mogu u sličnim eksperimentalnim uslovima različito reagovati, tj. one mogu ispoljiti različite osetljivosti prema istom mutagenu. Ovo je poznato iz mnogih eksperimenata sa ozračivanjem i u saglasnosti je s našim rezultatima. Poznato je da EMS indukuje strukturne hromozomne aberacije u nekih vrsta⁸. Prema rezultatima naših ispitivanja ova koncentracija nije delovala na hromozome paprike (sa izuzetkom lakih oštećenja centromera hromozomnih), mada je ona, verovatno, vrlo efektivna u pogledu indukcije genskih mutacija.

Ni 2% rastvor nije bio mnogo efektivan u pogledu irracijiranja hromozomnih mutacija u paprike, ako bi se to uporedilo, na primer, s efektivnošću 1% EMS u kukuruza⁸. Teške hromozomne aberacije su indukovane u paprike tek pomoću 3% rastvora EMS. Istina, ova doza je bila i visoko letalna (tab. 1), ali mi pretpostavljamo da su u tome učestvovali delimično i visoka temperatura od 20°C, kao i 8-časovni tretman.

Na osnovu prethodnog zaključili bismo da različita mišljenja istraživača o sposobnosti EMS da indukuje hromozomne mutacije mogu biti delimično rezultat eksperimentisanja s različitim vrstama koje se razlikuju i u pogledu osetljivosti prema dejstvu EMS.

Još jednom pitanju treba pokloniti pažnju. Mi smo našli na osnovu citoloških ispitivanja materinskih ćelica polena da, sa izuzetkom lakih oštećenja centromera, 1% EMS ne izaziva primetne efekte na hromozomima paprike, mada je primenjena koncentracija bila visoko letalna, naročito u 8-časovnim i 12-časovnim tretmanima. Ovo sugerise hipotezu da toksičnost učestvuje u velikoj meri u ukupnoj letalnosti. U pogledu ovoga interesantno je da se uporede podaci o nadživljavanju posle dejstva 1% EMS u toku 6 časova s podacima o delovanju u toku 12 časova (tab. 1). Samo podatak o letalitetu u M₁-generaciji nije dovoljno pouzdan za ocenu mutagene snage EMS. S genetičkog gledišta ocena hromozomnih mutacija studijom mikrosporogeneze M₁-generacije i analiza genskih mutacija u M₂- i M₃-generacijama neuporedivo su verodostojniji. Ovi podaci daju realniju ideju o kvalitativnim i kvantitativnim promenama u genetičkoj osnovi nadživelih članova tretirane populacije. Za dane vrste tada dobijamo realniju ocenu o mutagenim efektima raznih koncentracija EMS.

Verovatno ćemo biti u stanju da kažemo nešto više o ovim problemima kada ispitivanja M₂- i M₃- generacija budu kompletirana. Za sada možemo prikazati samo sirove podatke. Zabeležili smo, naime, 28,5%, 32,3% i 54,2% oštećenih biljaka u M₂-potomstvima, koja su odgajana posle tretmana sa 1%, 2%, odnosno 3% EMS. Među ovima je bilo oko 54% albino, virescentnih i drugih hlorofilnih defekata. Ostatak su predstavljale patuljaste forme i forme s malformacijama lista i stabla.

Literatura

1. Faveret E. A.: Somatic Mutations of Four Genes for Albinism in Barley Induced by X-rays and Ethyl Methanesulfonate. *Hereditas*, 46, 622—634, 1960.
2. Froese-Gertzen E. E. and Conzack C. F. et al.: Effect of Ethyl Methanesulfonate on Growth Response Chromosome Structure and Mutation Rate in Barley. *Radiation Botany*, 4, 61—69, 1963.
3. Ehrenberg L., Lundquist U. et al.: On the Mutagenic Action of Alcanesulfonic Esters in Barley. *Hereditas*, 56, 277—305, 1966.
4. Gaul H.: Mutation in der Pflanzenzüchtung. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 50, 194—307, 1963.
5. Natarajan A. T. and Upadhyaya M. D.: Localized Chromosome Breacage Induced by Ethyl Methanesulfonate and Hydroxylamine in *Vicia faba*. *Chromosoma*, 15, 156—169, 1964.
6. Moutschen J. and Degrave N.: Modifications dues aux arsénoxydes, des effets du méthane sulfonate d'éthyle sur les chromosomes de l'Orge. *Revue de Cytologie et Biologie Vegetale*, 29, 145—161, 1966.
7. Дубинина Л. Г. и Дубинин Н. Р.: Новое в действии алкилирующих соединений на мутации хромосом. *Генетика*, 2, 5—24, 1969.
8. Spasojević V.: Dinamika hromozomnih mutacija indukovanih etilmetansulfonatom i kafeinom. *Arhiv za poljoprivredne nauke*, 81, 122—134, 1970.

Primljeno 30. III 1971.

Redigovano 6. V 1971.

Cytologic Effect of Ethyl Methanesulfonate in Pepper

Spasojević V.

Institute for Vegetables — Smederevska Palanka

Webb R. E.

Plant Industry Station — Beltsville, Maryland 20750 USA

Summary

Air dry seed of pepper was treated with 1%, 2% and 3% ethyl methanesulfonate (EMS) for duration of 6, 8 and 12 hours, at a temperature of 20°C and pH adjusted to 7.

Data on the germinability and survival show a rather regular decrease of vitality with increased concentration of EMS and prolonged treatment. The survival is reduced by 20% when treatment with 1% EMS is extended from 6 hours to 12 hours, and 34% by the increase of concentration of EMS from 1% to 3% (in the 8 hour treatment).

Cytologic analyses of survived M₁-plants produced from seeds treated with 1% EMS, revealed that about 9% of metaphase I cells contained one non-oriented bivalent, an indication of a slight centromere abnormality. This was the only chromosome aberration observed after 1% EMS treatment. After 2% EMS treatment nonorientation of bivalents increased to 13.3% and 6.6% anaphase I cells contained chromatin bridges.

The frequency of chromosome aberrations was increased greatly by the 3% EMS treatment. The most frequent kinds of chromosome aberrations were pseudo-isochromosomes (25%), univalents in metaphase I (8%), dicentric chromatin bridges in anaphase I (9.26%), laggards and micronuclei in telophase I and II.

The results of our research confirm also that the centromere region is the most susceptible to the effects of EMS. Centromere injury in pepper was induced by 1% EMS, whereas more serious structural chromosome aberrations were induced only after 2% and 3% EMS. Also, on the basis of these facts we have concluded that the chromosomes of pepper are less susceptible than the chromosomes of some other plant species to the mutagenic effect of EMS.

Received 17. IV 1970.

Revised 6. V 1971.