

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Veronika BABIČ

**UPORABA TESTA MIKROJEDER
PRI PROUČEVANJU VPLIVA KOVIN NA RASTLINE**

DIPLOMSKO DELO

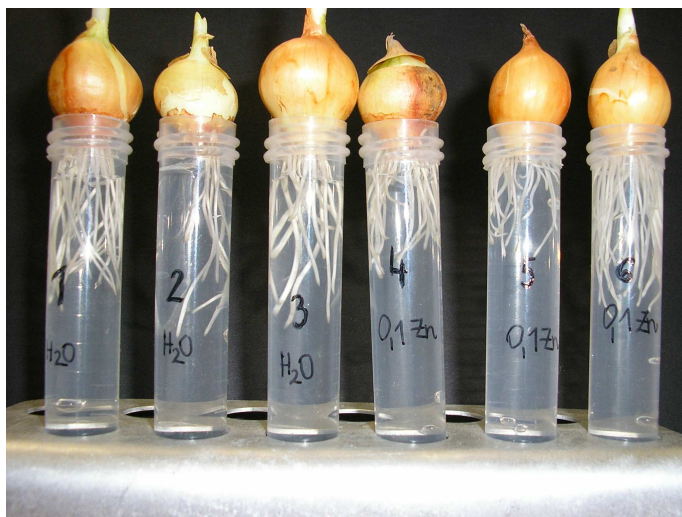
Univerzitetni študij

**APPLICATION OF THE MICRONUCLEUS ASSAY
FOR EVALUATION OF EFFECTS OF METALS ON PLANTS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008



»Modri nikdar ne teče po travi, ne da bi se zavedal, kaj dela. Modri se vedno zahvali in se opraviči travi, ki jo je pohodil, in ji obljubi svoje telo po svoji smrti. In ji obljubi gnojilo, morda ostanke svoje hrane, in te obljube se tudi resnično drži. Morda odstrani kaj, kar je v napoto temu polju, morda malo očisti, morda pošlje samo malo svoje energije, samo misel, in tako vrne.«

Koot Hoomi

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študijske zadeve Oddelka za biologijo je na seji dne 17. 6. 2005 za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Vilhar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Damjana DROBNE Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica:	doc. dr. Barbara VILHAR Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica:	doc. dr. Marjana REGVAR Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 17. 4. 2008

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Veronika Babič

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Ključna dokumentacijska informacija

ŠD Dn
DK UDK 575.24:546.3/.9:582(043.2)=163.6
KG čebula / genotoksičnost / kromosomske aberacije / kovine / etilmetansulfonat / test mikrojeder
AV BABIČ, Veronika
SA VILHAR, Barbara (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2008
IN UPORABA TESTA MIKROJEDER PRI PROUČEVANJU VPLIVA KOVIN NA RASTLINE
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP x, 48 str., 2 pregl., 17 sl., 1 pril., 44 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Preizkusili smo uporabnost testa mikrojeder za vrednotenje genotoksičnega učinka kovin kadmija (Cd) in cinka (Zn) na koreninske celice čebule (*Allium cepa*). V poskuse smo kot snov z znanim genotoksičnim oz. mutagenim učinkom vključili tudi etilmetansulfonat (EMS). Korenine čebule smo različno dolgo izpostavljali vodnim raztopinam z različnimi koncentracijami testnih snovi (0,00025 mM–10 mM Cd, 0,1 mM–5 mM Zn, 1 mM–40 mM EMS). Po izpostavitvi smo korenine fiksirali, pobarvali s Feulgenovo reakcijo in pogostost mikrojeder ocenjevali na pripravljenih mikroskopskih preparatih. Med testnimi snovmi in negativno kontrolo (vodo) večinoma nismo opazili statistično značilnih razlik v pogostosti mikrojeder. Ta je bila v primerjavi z negativno kontrolo večja le pri 2-urni izpostavitvi korenin 3 mM EMS. Pri koreninah, obdelanih s testnimi snovmi, smo opazili številne spremembe v izgledu kromosomov in jeder. Pri višjih koncentracijah Cd in EMS so se pogosteje pojavljale kromosomske aberacije kot pri nižjih koncentracijah teh snovi in pri negativni kontroli. Po obdelavi korenin z Zn smo opazili značilne spremembe jeder, ki so bile najbolj opazne pri kromosomih v mitozii (izgled ogrlice iz korald). V prisotnosti Cd in Zn smo opazili tudi počasnejšo rast korenin kot pri negativni kontroli. Ugotovili smo, da so za celostno vrednotenje genotoksičnosti testnih snovi s testom mikrojeder poleg ugotavljanja pogostosti mikrojeder pomembna tudi opazovanja in beleženja sprememb rastline in celic.

Key words documentation

DN Dn

DC UDC 575.24:546.3/.9:582(043.2)=163.6

CX onion / genotoxicity / metals / ethyl methanesulphonate / micronucleus assay / chromosome aberrations

AU BABIČ, Veronika

AA VILHAR, Barbara (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2008

TI APPLICATION OF THE MICRONUCLEUS ASSAY FOR EVALUATION OF EFFECTS OF METALS ON PLANTS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO x, 48 p., 2 tab., 17 fig., 1 ann., 44 ref.

LA sl

AL sl/en

AB We used the micronucleus (MN) assay for evaluation of genotoxic effects of metals cadmium (Cd) and zinc (Zn) on root tip cells of onion (*Allium cepa*). We also studied the effects of ethyl methanesulphonate (EMS) as a known genotoxic or mutagenic agent. Onion roots were exposed to aqueous solutions with different concentrations of test compounds (0.00025 mM–10 mM Cd, 0.1 mM–5 mM Zn, 1 mM–40 mM EMS) for different time periods. After exposure roots were fixed, stained with the Feulgen reaction and the MN frequency was scored on microscopic slides. In most cases the difference in MN frequency between the test compounds and the negative control was not significant. Compared with the negative control, the MN frequency was higher only in roots exposed to 3 mM EMS for 2 hours. We observed many changes in the appearance of chromosomes and nuclei of roots exposed to test compounds. Higher concentrations of Cd and EMS were associated with higher frequencies of chromosome aberrations than lower concentrations of the compounds and the negative control. After the treatment of roots with Zn, we observed characteristic changes of nuclei, in particular in chromosomes during mitosis (the string of beads appearance). In the presence of Cd and Zn, we observed inhibition of root growth compared to the negative control. The results of our study indicate that for a comprehensive evaluation of genotoxicity of test compounds with the MN assay, evaluation of the MN frequency should be complemented with observations of changes at the plant and cell level.

Kazalo vsebine

	str.
Ključna dokumentacijska informacija.....	iii
Key words documentation.....	iv
Kazalo vsebine.....	v
Kazalo preglednic.....	vii
Kazalo slik.....	viii
Seznam prilog.....	ix
Seznam okrajšav.....	x
1 Uvod.....	1
1.1 Genotoksične snovi.....	1
1.1.1 Etilmetansulfonat.....	2
1.1.2 Kovine.....	2
1.1.2.1. Cink.....	2
1.1.2.2. Kadmij.....	3
1.2 Rastlinski biotesti.....	4
1.2.1 Test mikro jeder.....	5
1.2.1.1. Mikro jedro.....	6
1.2.1.2. Izvedba testa.....	8
1.2.2 Kromosomske aberacije.....	9
2 Namen dela in hipoteze.....	10
3 Materiali in metode.....	11
3.1 Rastlinski material.....	11
3.2 Reagenti.....	11
3.3 Oprema.....	12
3.4 Opis postopkov.....	13
3.4.1 Rast korenin.....	14
3.4.2 Izpostavitve testnim snovem.....	14
3.4.3 Čas okrevanja in fiksacija korenin.....	16
3.4.4 Priprava preparatov.....	16
3.4.4.1. Barvanje DNA.....	16
3.4.4.1.1. Priprava mečkancev.....	17
3.4.5 Štetje mikro jeder.....	17
3.4.6 Statistična analiza.....	18
4 Rezultati.....	19
4.1 24-urna obdelava korenin s kadmijem in EMS (poskusa 1 in 2).....	19
4.2 24-urna obdelava korenin s cinkom in EMS (poskus 3).....	25
4.3 2-urna obdelava korenin s cinkom, kadmijem in EMS (poskus 4).....	30
5 Razprava in sklepi.....	35

5.1	Razprava	35
5.1.1	Obdelava z EMS	35
5.1.2	Obdelava s cinkom	37
5.1.3	Obdelava s kadmijem	38
5.1.4	Omejitve testa mikro jeder.....	39
5.2	Sklepi.....	41
6	Povzetek.....	42
7	Literatura	44

Zahvala

Priloge

Kazalo preglednic

Preglednica 1. Pregled poskusov	11
Preglednica 2. Vrste in koncentracije testnih snovi pri posameznih poskusih.	15

Kazalo slik

Slika 1. Nastanek mikro jeder.....	6
Slika 2. Nastanek mikro jedra iz acentričnega fragmenta.....	7
Slika 3. Shema poteka poskusa	13
Slika 4. Rast korenin.....	14
Slika 5. Razporeditev čebul pri izpostavitvi testnim kemikalijam	16
Slika 6. Število mikro jeder in mitozni indeks v koreninah čebul, izpostavljenih različnim koncentracijam kadmija (poskus 1) in EMS (poskusa 1 in 2).....	20
Slika 7. Konec izpostavitve pri poskusu 2.....	21
Slika 8. Velikost mikro jeder.....	22
Slika 9. Vpliv EMS in kadmija na koreninske celice čebule pri poskusu 1.....	23
Slika 10. Vpliv EMS na koreninske celice čebule pri poskusu 2	24
Slika 11. Število mikro jeder in mitozni indeks v koreninah čebul, izpostavljenih različnim koncentracijam cinka in EMS (poskus 3)	25
Slika 12. Neobičajne strukture na preparatih pri poskusu 3.....	27
Slika 13. Vpliv EMS na koreninske celice čebule pri poskusu 3	28
Slika 14. Vpliv cinka na koreninske celice čebule pri poskusu 3.....	29
Slika 15. Število mikro jeder in mitozni indeks v koreninah čebul, izpostavljenih različnim koncentracijam cinka, kadmija in EMS (poskus 4)	31
Slika 16. Vpliv cinka na koreninske celice čebule pri poskusu 4.....	33
Slika 17. Vpliv kadmija in EMS na koreninske celice čebule pri poskusu 4.....	34

Seznam prilog

Priloga A

Seznam okrajšav

DNA deoksiribonukleinska kislina (angl.: deoxyribonucleic acid)

EMS etilmetansulfonat

Cd kadmij

Zn cink

MJ mikro jedro

1 UVOD

Obremenjenost okolja s kovinami se je v zadnjih desetletjih močno povečala (Alloway in Ayres, 1993). Mnoge raziskave na celicah različnih organizmov kažejo na genotoksičnost nekaterih kovin (Fusconi in sod., 2006; Knasmüller in sod., 1998; Codina in sod., 1995; Deknudt in Deminatti, 1978). Na voljo je precej biotestov za ugotavljanje genotoksičnosti snovi (Maluszynska in Juchimiuk, 2005). Med njimi je tudi test mikro jeder, pri katerem se genotoksičnost izrazi s pojavom mikro jeder, ki jih lahko opazujemo na mikroskopskih preparatih.

Kadmij in EMS imata znane genotoksične učinke na mnoge organizme (Ünyayar in sod., 2006; Gichner in sod., 2004), genotoksičnost cinka pa ni bila ugotovljena (Walsh in sod., 1994). Test mikro jeder smo uporabili pri ugotavljanju genotoksičnosti kovin kadmija in cinka ter EMS in proučili vpliv teh snovi na čebulo (*Allium cepa*).

1.1 Genotoksične snovi

Človek s svojo dejavnostjo vpliva na povečano prisotnost mutagenih in genotoksičnih snovi v naravi. Vsako leto v okolje sprostimo okoli tisoč novih kemikalij (Voet in Voet, 1995), večinoma z neznanim učinkom na okolje in živa bitja. Za mnoge snovi je že znano, da škodljivo vplivajo na različne nivoje ekosistema. Ocenjujejo, da je v vsakodnevni uporabi nad 70.000 sintetičnih kemikalij. Od tega je kar 79 % takih, za katere ni nobene informacije v zvezi z njihovo toksičnostjo (Mitchell in sod., 2002).

Genotoksičnost zajema nastanek sprememb DNA – mutacij, poškodbe DNA in vezavo snovi ali njihovih presnovnih produktov na DNA. Genotoksični dejavnik reagira z DNA ali s celičnimi mehanizmi, ki zagotavljajo natančno podvajanje celičnega genoma. Povzroči lahko nastanek mutacij, ker se veže neposredno na DNA ali na beljakovine, ki sodelujejo pri popravljanju nastalih poškodb DNA. Če se genotoksična snov veže na delitveno vreteno celice, se lahko zgodi, da se po celični delitvi kromosomi ne razdelijo pravilno med dve hčerinski celici (Fatur in sod., 2005). Motnje v delovanju delitvenega vretena (aneugenost) in zlomi DNA verige (klastogenost) povzročajo nastanek kromosomskih aberacij in mikro jeder (Majer in sod., 2003).

1.1.1 Etilmetansulfonat

Etilmetansulfonat (EMS, $C_3H_8O_3S$) je mutagena snov, saj povzroči alkilacijo DNA, zato je pogosto uporabljan pri proučevanju genotoksičnih učinkov na organizme (Committee for Compounds Toxic to Reproduction, 2004). EMS lahko povzroči točkovne mutacije, delecije in zlome kromosomov (Yesilda, 2000), ki se lahko izrazijo kot kromosomske aberacije (Rank in Nielsen, 1997) in mikrojedra (Mouchet in sod., 2005). Na meristemske celice koreninskega vršička čebule EMS deluje mutageno (Aslanturk in Celik, 2005). Pri kometnem testu, pri katerem se merijo poškodbe DNA zaradi vpliva genotoksičnih snovi, EMS pogosto uporabljajo kot pozitivno kontrolo (Gichner in sod., 2004).

1.1.2 Kovine

Onesnaženost s kovinami vsako leto narašča (Majer in sod., 2002). Analiza citotoksičnih učinkov nekaterih kovin je pokazala, da so potencialni mutageni ter da povzročajo tumorje pri eksperimentalnih organizmih in človeku, ki jim je izpostavljen (Garcia-Rodríguez in sod., 2001). Vse kovine so naravne sestavine okolja, ki jih lahko najdemo na različnih nivojih tal in površinskih voda. Nekatere so t.i. esencialni elementi, potrebni za normalen potek metabolizma organizmov, npr. baker (Cu), železo (Fe) in cink (Zn), medtem ko so druge neesencialne in nimajo posebne biološke vloge, npr. kadmij (Cd), krom (Cr) in svinec (Pb). Neesencialne kovine zaradi kemijske podobnosti pogosto tekmujejo z esencialnimi, npr. kadmij z bakrom in cinkom, toksične pa postanejo, ko dosežejo raven, pri kateri poškodujejo življenjske funkcije organizmov. Esencialne kovine so v osnovi manj toksične kot neesencialne, a postanejo toksične, ko se pojavijo v zvišanih koncentracijah v okolju (Van Dyk, 2003).

1.1.2.1. Cink

Cinkove soli v topni ali netopni obliki so stalno prisotne v industrijskih odpadkih. Cink je prevladujoča komponenta rudniških odpadnih voda. Velja za eno izmed najmanj nevarnih kovin (Van Dyk, 2003).

Cink je esencialni mikroelement, pomemben tako za živali kot za rastline. Igra pomembno vlogo pri mnogih metabolnih procesih rastlin, sodeluje pri sintezi avksina (regulacija rasti rastline), nujen je za sintezo klorofila (Vitosh, 1994). Cink aktivira encime in sodeluje pri proteinski sintezi in metabolizmu nukleinskih kislin in lipidov. Z DNA in RNA tvori komplekse in s tem vpliva na stabilnost teh dveh molekul.

Visoke koncentracije cinka imajo lahko negativne učinke na privzem mineralov in encimsko aktivnost, povezano z metabolizmom (Bonnet in sod., 2000). Francis in sod. (1995) so proučevali vpliv cinka na celični cikel pri celični suspenziji tobaka (*Nicotiana tabacum*) in ugotovili, da v visokih koncentracijah cink lahko ustavi celični cikel ali povzroči smrt celic.

1.1.2.2. Kadmij

Kadmij je neesencialni element, ki nima biološke funkcije (Van Dyk, 2003). Je široko razširjena kovina, ki jo v okolje spuščajo elektrarne, toplotarne, kovinsko-predelovalna industrija, sežigalnice smeti, prevozna sredstva, cementarne ter je stranski produkt pri proizvodnji fosfatnih gnojil. Velja za enega izmed najpomembnejših onesnaževalcev, ki vpliva na vse organizme zaradi svoje visoke toksičnosti in dobre topnosti v vodi in prsti (Liu in Kottke, 2004).

Akumulacija kadmija pri rastlinah povzroči zmanjšanje fotosintezne aktivnosti, privzema vode in hranil, kar se na rastlini izrazi v pojavu kloroz (Ünyayar in sod., 2006). Kadmij lahko ustavi celično delitev in celično rast pri čebuli (Liu in sod., 1992).

Kadmijeve soli so genotoksične in lahko povzročijo nastanek kromosomskih aberacij (c-mitoza, anafazni most, zlepljanje kromosomov) in mikro jeder (Ünyayar in sod., 2006). Različne koncentracije kadmija povzročijo različne ultrastrukturne spremembe celic v korenini čebule. Nizke koncentracije lahko vodijo v povečano vakuolizacijo in oblikovanje majhnih citoplazemskih veziklov, ki so pogost pojav pri obdelavah z nizkimi koncentracijami različnih kovin. Kljub tem spremembam nizke koncentracije kadmija ne vplivajo bistveno na rast rastline. Kadmij pri nižjih koncentracijah (0,001–0,1 mM, čas izpostavitve 48 ali 72 ur) lahko celo pospeši rast korenin. Pri višjih koncentracijah kadmija (1 mM in 10 mM) pa pride do poškodb membranskega sistema, zmanjšanja števila mitohondrijskih krist, hude plazmolize in zmanjšanja števila ribosomov. Take strukturne

spremembe končno vodijo v smrt večine celic, kar se izrazi v zaustavljeni rasti korenin (Liu in Kottke, 2004).

Raziskave na celičnih kulturah tobaka so pokazale, da je od koncentracije kadmija odvisen mehanizem celične smrti. Nizka koncentracija kadmija (0,01 mM) nima vpliva na celično viabilnost ali DNA, medtem ko dovolj visoka koncentracija (1 mM) na hitro ubije celice, pri čemer ne pride do fragmentacije kromatina. Srednja koncentracija (0,05–0,1 mM) kadmija sproži programirano celično smrt, podobno apoptozi pri živalskih celicah, kar so ugotovili s proučevanjem fragmentacije DNA (Fojtová in Kovařík, 2000). Behboodi in Samadi (2004) sta proučevala vpliv kadmija na obliko celične smrti pri čebuli ter odkrila, da srednje visoke koncentracije kadmija sprožijo programirano celično smrt, podobno apoptozi, pri dovolj visoki koncentraciji kadmija pa nastopi nekroza, ki vodi v lizo celice.

1.2 Rastlinski biotesti

Zaradi povečanja onesnaženosti okolja se pojavlja potreba po hitrih in natančnih metodah za zaznavo in oceno vplivov neznanih snovi na organizme (Maluszynska in Juchimiuk, 2005). Za ugotavljanje genotoksičnosti snovi je razvitih nekaj standardiziranih testnih sistemov, kljub temu pa splošnih predpisov za eko-toksikološka testiranja ni. Zato se monitoring okolja v večini primerov izvaja s pomočjo kemijskih analiz za posamezno spojino. Samo na osnovi meritev koncentracij posameznih kemikalij je nemogoče napovedati biološke posledice onesnaževanja ekosistemov (Uhl in sod., 2003). Za celostno vrednotenje vplivov snovi na organizme so bili razviti t. i. biotesti, pri katerih žive organizme izpostavimo določenim dejavnikom in opazujemo njihov odziv. Zaradi konzervativne strukture genskega materiala lahko pri genotoksikoloških testih uporabljamo različne organizme – bakterije, glive, rastline in živali (Maluszynska in Juchimiuk, 2005).

Med več kot 200 znanimi biotesti iz literature so rastlinski biotesti na splošno bolj občutljivi od ostalih sistemov za zaznavo genotoksičnih vplivov snovi. Rastlinski sistemi so izjemno uporabni pri zaznavanju mutagenov, klastogenov in karcinogenov. Rastline zaradi svojih edinstvenih lastnosti lahko uporabimo pri *in situ* monitoringu toksičnih snovi iz okolja, ki se pojavljajo samostojno ali v kompleksni obliki (Ma, 1999). Za določitev kvalitete vode, zraka in zemlje je zelo pomembna izbira primerne testne rastline. Vplivanje mutagenov iz okolja na rastline ni odvisno samo od tipa mutagena, časa izpostavitve, doze

in interakcije z drugimi dejavniki, temveč je odvisno tudi od vrste, genotipa in faze razvoja rastline (Maluszynska in Juchimiuk, 2005). Za analizo koreninskega vršička se najpogosteje uporabljajo vrste čebula (*Allium cepa* L.), lasasti dimek (*Crepis capillaris* (L.) Wallr.), navadni ječmen (*Hordeum vulgare* L.), navadni grah (*Pisum sativum* L.), tradeskancija (*Tradescantia* sp.), bob (*Vicia faba* L.) in koruza (*Zea mays* L.). Za citogenetske raziskave so najbolj primerne rastline, ki imajo majhno število velikih kromosomov (cit. v Grant, 1999).

Večina biotestov višjih rastlin temelji na zaznavi kromosomskih aberacij in izmenjav sestrskih kromatid ter na analizi zlomov verige DNA (Maluszynska in Juchimiuk, 2005). Rastlinski biotesti, pri katerih opazujemo pojav mikro jeder, poškodbe DNA in kromosomske aberacije, so na splošno poceni in hitro izvedljivi. Aplikacija teh testov je še posebej primerna za območja, kjer je finančna pomoč za oceno in spremljanje onesnaženosti okolja majhna (Uhl in sod., 2003).

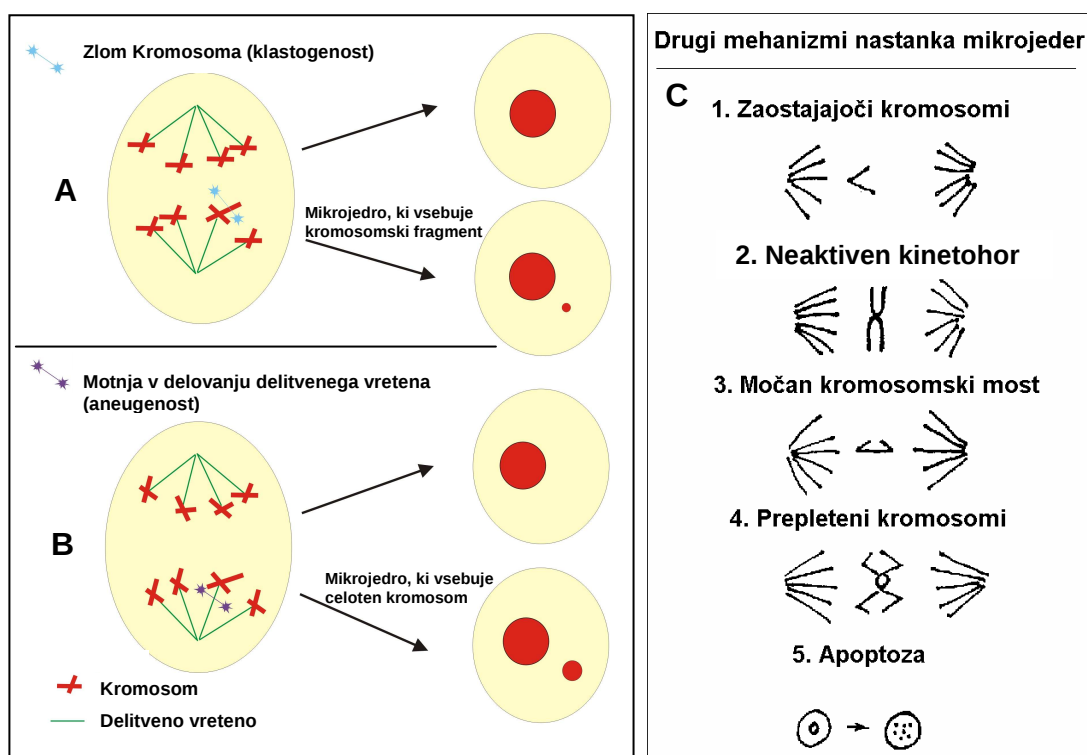
1.2.1 Test mikro jeder

Test mikro jeder je citogenetski test, s pomočjo katerega ocenjujemo genotoksičnost testne snovi. Če pride do poškodb dednine, se lahko tvorijo mikro jedra – skupki jedrne vsebine, po obliki in strukturi podobni jedru, vendar manjši, ki jih opazujemo pod mikroskopom. Pri rastlinah ga lahko izvajamo na celicah koreninskega vršička (najpogosteje pri čebuli in bobu; Ma in sod., 1995) ali v socvetju, kjer mikro jedra opazujemo v fazi zgodnjih tetrad (pri tradeskanciji; Uhl in sod., 2003).

Test mikro jeder koreninskih vršičkov čebule so l. 1959 razvili Evans in sod., na podlagi odkritja mikro jeder po obdelavi z γ -žarki. Arora in sod. (1969) so bili prvi, ki so uporabili test mikro jeder pri bobu, in sicer za zaznavo vodotopnih klastogenov. Na določenih živalskih celicah test mikro jeder uporabljajo pri proučevanju učinkov industrijskih kemikalij in farmacevtskih produktov, ki bi utegnili povzročiti poškodbo DNA. Rastlinski testi mikro jeder so bili razviti predvsem za monitoring kompleksnejših mešanic in nevarnih snovi v okolju, ki so posledica onesnaževanja vode in tal. Test mikro jeder na tradeskanciji uporabljajo tudi pri raziskavah plinskih mešanic in onesnaženega zraka (Majer in sod., 2003).

1.2.1.1. Mikrojedro

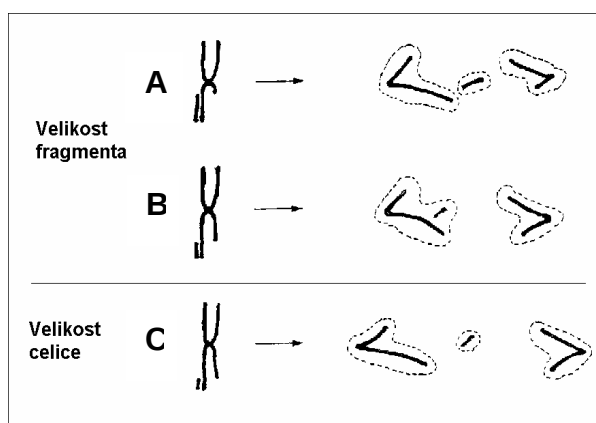
Mikrojedro je izvenjedrno telo kromatinskega materiala, ki je posledica (1) zloma kromosoma – klastogenost (slika 1A) ali (2) motenega delovanja delitvenega vretena – aneugenost (slika 1B). V prvem primeru mikrojedro vsebuje kromosomski fragment, ki mu manjka centomer, zato se imenuje acentrični fragment, v drugem pa je v mikrojedro vključen celoten kromosom (Uhl in sod. 2003). Običajno je mikrojedro, ki vsebuje celoten kromosom, večje od tistega, ki vsebuje samo fragment (sliki 1A in 1B; Heddle in sod., 1991).



Slika 1. **Nastanek mikrojedr.** A – zlom kromosoma; B – moteno delovanje delitvenega vretena; C – različni mehanski vzroki kromosomskih zlomov in izmenjav (1: prepočasno potovanje kromosoma, ki ostane zunaj jedra, 2: neaktivnost kinetohora, 3: močan kromosomski most, 4: prepletenost kromosomov, 5: apoptoza). Prirejeno po Mišik (2006) in Heddle in sod. (1991).

Fragment brez centromera (odsotnost kinetohora) in kromosom, ki ni pripet na delitveno vreteno, v anafazi celične delitve ne moreta usmerjeno potovati na pol celice, kjer se kasneje oblikuje novo jedro. Zato ostaneta zunaj glavnega jedra, razen če po naključju ne prispeta do pola in postaneta del novo nastalega jedra, kar je lahko odvisno od velikosti fragmenta (ali kromosoma) in velikosti celice. Manjši fragment se v majhni celici lažje vključi v nastajajoče glavno jedro (slika 2B), večji fragment pa v isti celici bolj verjetno

postane mikrojedro (slika 2A). Manjši fragment v veliki celici običajno ostane zunaj glavnega jedra in postane mikrojedro, saj v večji celici kromosomi v anafazi prepotujejo daljšo razdaljo in je verjetnost, da bo odlomljeni fragment v bližini novo nastajajočega jedra, majhna (slika 2C). Vsi acentrični fragmenti ne postanejo mikrojedra pri prvi celični delitvi, ampak se nekateri podvojijo in postanejo mikrojedra v drugi ali eni od naslednjih delitev (Heddle in sod., 1991). Kadar se kromosom (ali fragment) ne vključi v novo nastalo jedro in ga v telofazi celične delitve obda jedrna membrana, postane mikrojedro. Kromosom se nato odvijae in postopoma prevzame morfologijo jedra v interfazi (Fenech, 2000). Celice, ki vsebujejo mikrojedra, se običajno ne delijo in večinoma propadejo v F1 generaciji (Ma in sod., 1995).



Slika 2. **Nastanek mikrojedra iz acentričnega fragmenta.** Velikost fragmenta in velikost celice lahko vplivata na to, ali se bo fragment vključil v hčerinsko jedro ali bo postal mikrojedro: A – večji fragment v majhni celici postane mikrojedro, B – majhen fragment se v majhni celici vključi v nastajajoče glavno jedro, C – majhen fragment v veliki celici postane mikrojedro. Prirejeno po Heddle in sod. (1991).

Pri živalskih celicah sta poleg klastogenosti in anevgenosti, opisana še dva mehanizma po katerih mikrojedra in mikrojedrom podobne strukture lahko nastanejo: (3) različni mehanski vzroki kromosomskih zlomov in izmenjav (slika 1C: 1–4) in (4) apoptoza (slika 1C: 5). Apoptoza je programirana celična smrt, ki med drugim povzroči razpad jedra in citoplazme v telesca, obdana z membrano (t. i. apoptotska telesa). Je posledica naravnega procesa ali pa je odziv na poškodbo zaradi kemičnih vplivov, ki sama po sebi ni nujno genetskega izvora. Za nastanek mikrojedr, ki so posledica citogenetskih poškodb, je za razliko od mikrojedr, ki so posledica apoptoze, potrebna celična delitev. Apoptotske celice so nenormalne, ker vsebujejo skupek jedrnih fragmentov brez normalnega jedra. Celice, ki vsebujejo mikrojedra, ki izhajajo iz citogenetskih sprememb, pa vsebujejo normalna jedra in samo eno mikrojedro, redko več.

Tudi pri rastlinskih celicah lahko pride do različnih mehanskih vzrokov kromosomskih zlomov in izmenjav, medtem ko apoptoze, ne moremo upoštevati, ker ta v takšni obliki kot pri živalskih celicah ne obstaja. Vendar pa sta Behboodi in Samadi (2004) opazila apoptozi podoben pojav pri koreninskem vršičku čebule, obdelanem s kadmijem, s pomočjo testa TUNEL in DNA gelske elektroforeze. Opazila sta krogle kondenziranega kromatina, kondenzirano in obrobno jedro, fragmentirano DNA in telesa, ki so bila podobna apoptotskim telesom živalskih celic.

1.2.1.2. Izvedba testa

Test mikrojeder koreninskega vršička izvedemo tako, da korenine testne rastline za določen čas izpostavimo testnim snovem. Po izpostavitvi običajno rastline za nekaj časa prenesemo v vodo, da se poškodba DNA lahko izrazi v obliki mikrojeder v hčerinskih celicah. Ta čas imenujemo čas okrevanja (angl.: recovery period), ki pa ne pomeni vrnitve jedra v prvotno stanje pred poškodbo (Ma, 2006). Korenine nato fiksiramo ter obarvamo in mikrojedra opazujemo na mikroskopskih preparatih.

Čebula je kot citogenetski testni organizem primerna predvsem zaradi velikih kromosomov – osem parov ($2n = 16$), zaradi česar lažje opazimo kromosomske aberacije in mikrojedra. Na voljo je v vseh letnih časih, lahko jo je gojiti, je poceni in njena uporaba pri testu mikrojeder ne zahteva drage laboratorijske opreme, kot so rastlinjaki ali rastne komore (Fras in Maluszynska, 2003).

Za oblikovanje mikrojeder je potrebna celična delitev (Heddle in sod., 1991; Uhl in sod., 2003), zato pojav mikrojeder najlažje opazujemo pri celicah, ki se hitro delijo. Pri testu mikrojeder koreninskega vršička proučujemo vpliv na hitro deleče se meristemske celice. Ma in sod. (1995) so opazili, da se največja pogostost mikrojeder izrazi v F1 regiji koreninskega vršička čebule po 44 urah od izpostavitve celic rentgenskim žarkom. Tak čas okrevanja, na podlagi 24-urnega celičnega cikla koreninskih celic čebule, zajame mikrojedra, ki so bila inducirana okoli G1 ali S faze materinskih meristemskih celic in ki se nato pojavijo v interfazi ali profazi hčerinskih celic (Ma in sod., 1995).

Nekatere testne snovi povzročajo mitozni zaostanek – zmanjša se mitozni indeks, ki zavira nastanek mikrojeder. V tem primeru se pojavi višja frekvenca anafaznih mostov, zaradi česar je treba poskus ponoviti z daljšim časom okrevanja. Zato je kot dodatek k oceni

števila mikrojeder koristno oceniti tudi število aberacij anafaznih celic (Majer in sod., 2003) in določiti mitozni indeks (Fras in Maluszynska, 2003).

Kriteriji za določanje mikrojeder pri rastlinskih biotestih niso posebej definirani, zato so pri raziskavah rastlin praviloma povzeti po kriterijih za mikrojedra celic sesalcev. Na splošno za mikrojedra velja, da (1) sta intenziteta obarvanosti kromatina in vzorec barvanja podobna kot pri glavnem jedru, (2) so meje razločno prepoznavne, kar nakazuje prisotnost jedrne membrane, (3) so gladka in je oblika okrogla ali ovalna, (4) so ločena od glavnega jedra, (5) so v isti optični ravnini kot glavno jedro in (6) so znotraj iste citoplazme kot jedro. Pomembna razlika med mikrojedri živalskih in rastlinskih celic je, da so mikrojedra slednjih lahko večja, zaradi manjšega števila večjih kromosomov večine testnih rastlin (Majer in sod., 2003). Mikrojedra človeških limfocitov imajo premer med $1/16$ in $1/3$ povprečnega premera jedra. Fenech (2000) pri ocenjevanju mikrojeder celic sesalcev upošteva še: (8) lahko se dotikajo glavnega jedra, a ga ne smejo prekrivati, (9) ponavadi imajo enako intenziteto obarvanja kot glavno jedro, a je včasih intenziteta pri mikrojedrih lahko večja.

1.2.2 Kromosomske aberacije

Kromosomske aberacije so spremembe kromosomov – izrazijo se kot nenormalna oblika kromosomov in nastanejo zaradi izgube dela kromosoma (delecije), podvojitve (duplikacije), translokacije, inverzije in drugih sprememb. So posledica preloma dvojne vijačnice DNA, ki ni bil popravljen ali pa je bil popravljen nepravilno (Maluszynska in Juchimiuk, 2004). Izrazijo se pri celicah v mitozu pri prvem celičnem ciklu po obdelavi z mutagenom kot: zlepljena kromosomska masa, lom kromosomov, c-mitoza (motnje delitvenega vretena), zaostajajoči kromosomi, kromosomska zanka, nepravilno despiraliziranje kromosoma, močno obarvana citoplazma, izrazito jedro, neenakomerno kondenziran kromatin, pojav anafaznega mostu, nastanek več kot dveh polov, kromosomi, ki se v ekvatorialni ravnini razdelijo na dva dela, kromosomi, ki se niso zmožni zbrati v ekvatorialni ravnini itn. V interfaznih celicah naslednjega celičnega cikla se večina kromosomskih aberacij izrazi kot mikrojedro, ne pa vse, kar je treba upoštevati, kadar primerjamo testa kromosomskih aberacij in mikrojeder (NATO, 2004).

Za zaznavo kromosomskih aberacij je razvitih veliko biotestov z rastlinami, kot so tradeskancija, paradižnik (*Lycopersicon esculentum*), ječmen, bob in čebula (Maluszynska in Juchimiuk, 2005). Teste kromosomskih aberacij, narejene na koreninskih celicah, ki so časovno precej potratni (Uhl in sod., 2003), je zamenjal test mikrojeder koreninskih vršičkov, ki je bil razvit vzporedno s testom kromosomskih aberacij (Maluszynska in Juchimiuk, 2004). Ta je preprostejši za uporabo, a kljub temu omogoča zaznavanje enakih poškodb DNA (Majer in sod., 2003). Primerjalne študije nakazujejo, da je test mikrojeder enako občutljiv za zaznavo genotoksinov kot test kromosomskih aberacij (Uhl in sod., 2003).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen diplomskega dela je bil preizkusiti test mikrojeder na koreninskem vršičku čebule kot ustrezno metodo za vrednotenje genotoksičnih učinkov Cd, Zn in EMS. Na osnovi predhodnih objav smo pričakovali večjo pogostost mikrojeder pri koreninah, obdelanih z omenjenimi snovmi, kot pri negativni kontroli (obdelavi korenin z vodo). Domnevali smo, da bo pri višjih koncentracijah testnih snovi večja poškodovanost DNA in s tem večja pogostost mikrojeder kot pri nižjih koncentracijah (koncentracijsko odvisni odgovor).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Rastlinski material

Testna rastlina je bila čebula – sorta čebulček Holandska rumena. Za poskuse smo čebule kupovali sproti v Semenarni (Ljubljana; glej datum izdaje etikete v preglednici 1).

Preglednica 1. **Pregled poskusov.** Datum izdaje etikete – oznaka na kupljeni vrečki čebul (Semenarna, Ljubljana)

Poskus (interna oznaka poskusa)	Tip in koncentracija mutagene snovi	Čas izpostavitve mutageni snovi	Datum izdaje etikete	Začetek poskusa
Poskus 1 (AT03)	CdCl ₂ (0,00025 mM–10 mM) EMS (1 mM – 40 mM)	24 ur	3. 1. 2006	17. 3. 2006
Poskus 2 (AT04)	EMS (1–40 mM)	24 ur	25. 8. 2006	20. 11. 2006
Poskus 3 (AT05)	ZnSO ₄ (0,1–1,0 mM) EMS (1–8 mM)	24 ur	3. 1. 2007	23. 2. 2007
Poskus 4 (AT06)	ZnSO ₄ (1–5 mM) CdCl ₂ (0,00025–0,025 mM) EMS (3 mM)	2 uri	3. 1. 2007	18. 5. 2007

Izbrali smo na pogled zdrave čebule, približno enake velikosti (premer čebule 2 cm) in oblike. Hranili smo jih v hladilniku. Čebule, uporabljene pri poskusih 3 in 4, so bile iz iste serije, med poskusoma je 3 mesece razlike.

3.2 Reagenti

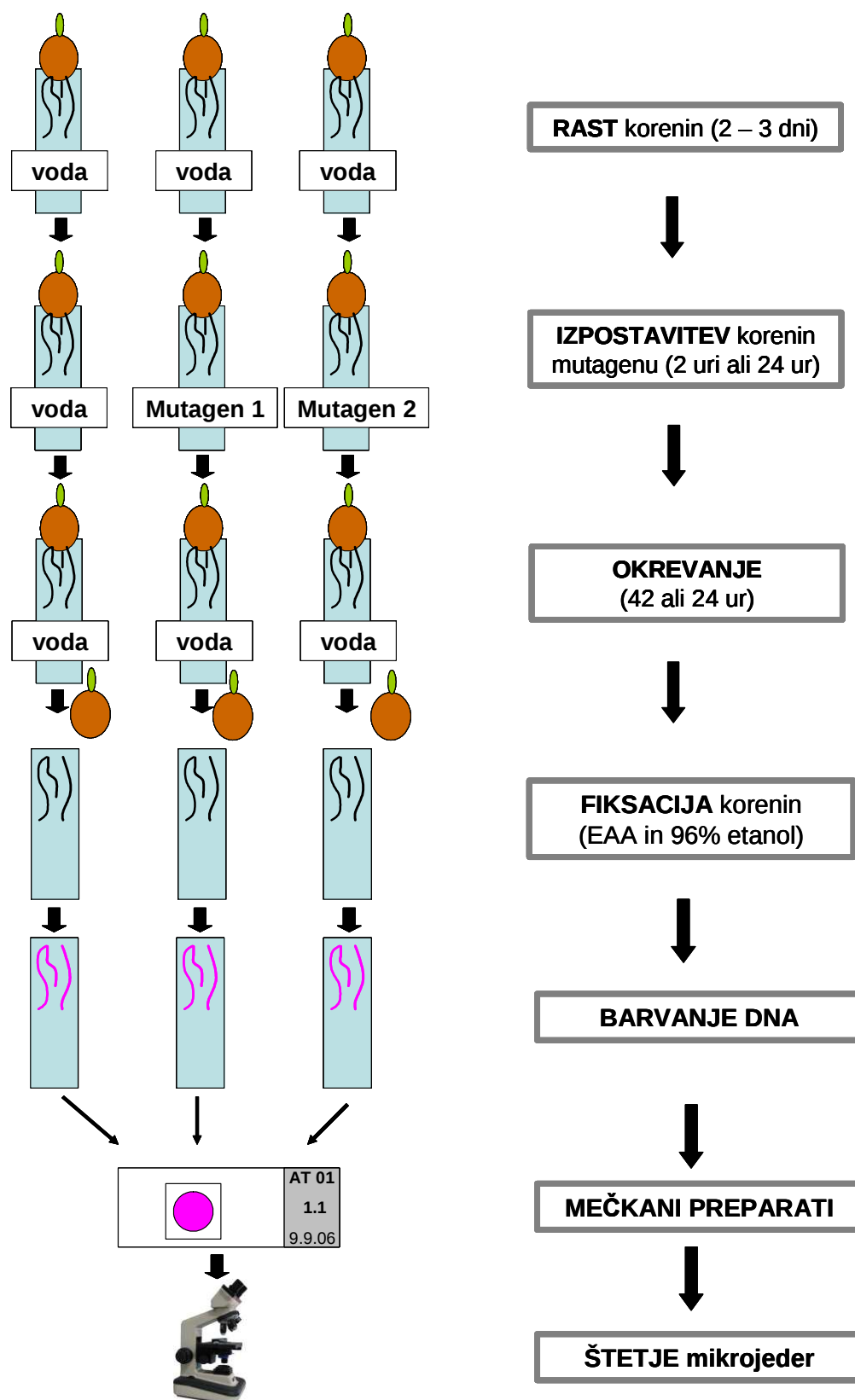
Za fiksacijo rastlinskega tkiva v Farmerjevem fiksativu (EAA) smo uporabili mešanico 3:1 (v/v) absolutni alkohol : led očetna kislina (Scharlau AC 0352), za hidrolizo smo uporabili 5 M HCl, DNA smo barvali s Schiffovim reagentom. Za pripravo mečkancev smo uporabili 45% očetno kislino. Pri poskusu 4 smo preparate pobarvali z barvilom Fast Green, ki obarva celične stene. Pri fiksaciji in barvanju s Fast Green barvilom smo uporabljali 96% in absolutni etanol.

Testne snovi so bile kadmijev klorid (CdCl_2), cinkov sulfat (ZnSO_4) in etilmetansulfonat (EMS). Koncentracija CdCl_2 zaradi kemijske sestave ustreza koncentraciji kadmija (število molov Cd ustreza številu molov CdCl_2). Enako velja za ZnSO_4 in cink.

3.3 Oprema

Uporabljali smo standardno laboratorijsko opremo – objektnike, krovnike, laboratorijsko steklovino, pincete, pipete, plastične 15 ml centrifugirke za rast korenin (v nadaljevanju epruvete), stojala za epruvete, škarje, igle, britvice, termostabilno vodno kopel, filter papir, alu-folijo. Do priprave mečkancev smo delo opravljali v digestoriju, nato pa na laboratorijskem pultu. Za obdelavo preparatov in fotografiranje smo uporabljali svetlobni mikroskop Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss, Nemčija) z objektivimi 2,5 $\times$, 10 $\times$, 40 $\times$, 63 $\times$ (oljni), 100 $\times$ (oljni) in okularjem z 10 $\times$ povečavo. Za zajem slike smo uporabljali barvno digitalno kamero (AxioCam MRc, Carl Zeiss Vision, Nemčija) z ločljivostjo 1300 $\times$ 1030 pikslov in program za zajem in osnovno analizo slike (AxioVision, Carl Zeiss Vision). Za štetje mikrojeder smo uporabljali tudi mikroskop Olympus CHS z objektivimi 4 $\times$, 10 $\times$, 40 $\times$ in 100 $\times$ (oljni) in okularjem z 10 $\times$ povečavo. Pri pripravi mečkancev smo uporabljali lupo Opti lab1 (Motic).

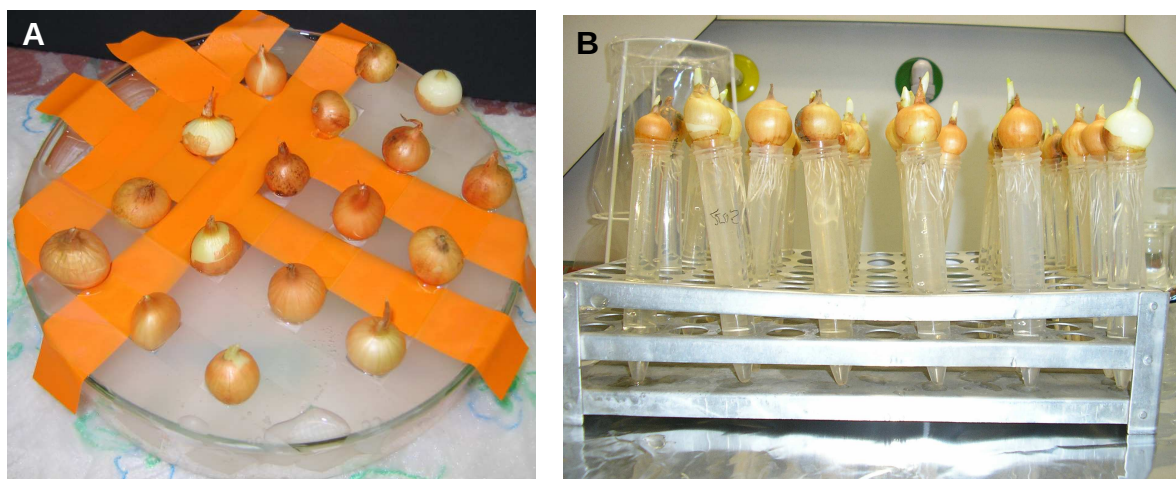
3.4 Opis postopkov



Slika 3. Shema poteka poskusa.

3.4.1 Rast korenin

Čebulam smo odstranili zunanje suhe luskoliste, najbolj notranjega pa smo pustili, da ne bi prišlo do prevelike transpiracije, saj bi se nivo raztopin v epruvetah zato hitreje znižal in korenine ne bi bile ves čas popolnoma potopljene v raztopini. Z nožem smo rahlo podrgnili po spodnji strani (stebelni krožec), da bi koreninam olajšali rast. Čebule smo sprali z navadno vodo in jih postavili v oprane epruvete, napolnjene z destilirano vodo (slika 4B). Čebule smo potopili v vodo do največ polovice dolžine čebule. Najbolj primerne so čebule podolgovate oblike, ki se lepo uležejo v vrat epruvete. Pri poskusu 1 smo namesto epruvet uporabili veliko petrijevko, ki smo jo prelepili z lepilnim trakom (slika 4A), čebule pa vstavili med odprtine. Ta tehnika se ni dobro obnesla, saj je zaradi prevelikih odprtin prišlo do prevelikega izhlapevanja vode, zaradi teže so bile sredinske čebule bolj potopljene kot tiste na robu, oranžen lepilni trak pa je obarval vodo. Čebule v vodi smo postavili v zatemnjen in čist digestorij pri temperaturi $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Vodo smo dolivali vsak dan. Po 2–3 dneh smo imeli čebule z 10–20 koreninami, dolgimi 2–5 cm, ki smo jih lahko uporabili pri poskusu.



Slika 4. **Rast korenin.** A – neprimerna postavitev poskusa s petrijevko, saj je voda zaradi velikih odprtin prehitro izhlapevala, oranžni lepilni trak pa je obarval vodo. B – primerna postavitev poskusa pri poskusu 4.

3.4.2 Izpostavitve testnim snovem

Pripravili smo si serijo raztopin z različnimi koncentracijami testnih snovi, v katere smo iz vode prestavili čebule s koreninami. Za vsak poskus smo posebej izbrali vrsto in

koncentracije testnih snovi (preglednica 2) ter nastavili negativno kontrolo z destilirano vodo. Koncentracije testnih snovi smo izbrali na podlagi podatkov iz literature. Pri poskusih 1 in 2 smo izbrali najvišje koncentracije, ki smo jih zasledili v literaturi, pri tem pa smo imeli tudi velik razpon koncentracij Cd in EMS z namenom, da ugotovimo pri katerih koncentracijah se tvorijo mikro jedra.

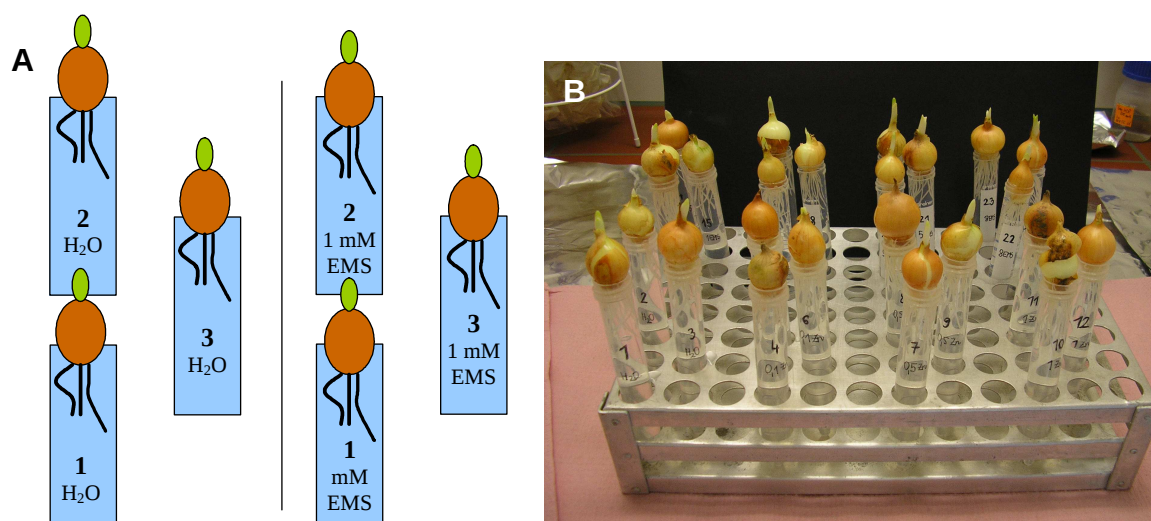
Preglednica 2. Vrste in koncentracije testnih snovi pri posameznih poskusih.

Poskus	Raztopina	Koncentracija (mM)
1	CdCl ₂	0,00025, 0,0025, 0,025, 0,25, 2,5, 10
	EMS	1, 3, 5, 8, 20, 40
2	EMS	1, 3, 5, 8, 20, 40
3	ZnSO ₄	0,1, 0,5, 1,0
	EMS	1, 3, 5, 8
4	ZnSO ₄	1, 3, 5
	CdCl ₂	0,00025, 0,0025, 0,025
	EMS	3

Epruvete so bile razporejene v posebnem vrstnem redu (slika 5), da ne bi prišlo do napak, hkrati pa smo tako lažje uspeli ohraniti enake razmere za vse, saj smo čebule predstavljali po vrstnem redu: prva čebula prve koncentracije (1/1), prva čebula druge koncentracije (1/2) ..., druga čebula prve koncentracije (2/1), druga čebula druge koncentracije (2/2) itn. (slika 5A). Vsaka epruveta je bila označena s svojo številko (slika 5B).

Pri poskusih 1, 2 in 3 smo čebule testnim snovem izpostavljali 24 ur, pri poskusu 4 pa 2 uri. Pri poskusu 2 smo tri čebule izpostavili 40 mM EMS za 48 ur, brez okrevanja.

V času izpostavljanja in okrevanja so bile čebule shranjene v zatemnjenem prostoru pri temperaturi 23 ± 2 °C.



Slika 5. Razporeditev čebul pri izpostavitvi testnim kemikalijam. A – shema razporeditve. Številke označujejo vrstni red epruvet pri posamezni obdelavi; B – postavitev pri poskusu. Vsaka epruveta je imela svojo številko.

3.4.3 Čas okrevanja in fiksacija korenin

Po izpostavitvi smo korenine sprali z destilirano vodo, da smo odstranili ostanek testnih raztopin, in vzorce prenesli v destilirano vodo. Pri 24-urni izpostavitvi rastlin je bil čas okrevanja dolg 24 ur, pri poskusu 4, pri katerem smo rastline testnim snovem izpostavljali samo 2 uri, smo čas okrevanja podaljšali na 42 ur, kot to predlagajo Ma in sod. (1995). Za fiksacijo smo odrezali približno 3 cm dolge korenine in jih vstavili v Farmerjev fiksativ (EAA) pri 4 °C za približno 24 ur, nato smo jih prestavili v 96% etanol za dolgotrajnejše shranjevanje pri –20 °C. Farmerjev fiksativ smo pripravljali sproti pred vsakim poskusom, vzorce pa hranili v dobro zaprtih in označenih 10 ml stekleničkah.

3.4.4 Priprava preparatov

3.4.4.1. Barvanje DNA

Pred barvanjem smo korenine zvezali s sukancem. Po 4 korenine iste čebule smo na stekleni ploščici v kapljici etanola zavezali z določeno barvo sukanca – vsaka barva sukanca je ustrezala določeni koncentraciji testne snovi. Snope korenin, ki so bili označeni

s sukancem, smo lahko barvali skupaj v eni ali dveh stekleničkah, kar nam je olajšalo barvanje.

DNA smo obarvali z reakcijo po Feulgenu: najprej smo v destilirani vodi sprali fiksativ iz vzorcev in jih hidrolizirali s 5 M HCl. Vzorce smo s Schiffovim reagentom barvali 120 minut pri 20 °C v vodni kopeli. Prebitek barvila smo iz vzorcev spirali z SO₂ vodo. Do priprave mečkancev smo pobarvane vzorce hranili v destilirani vodi. Postopek barvanja je podrobno opisan v Dolenc Koce (2001).

3.4.4.1.1. Priprava mečkancev

Mečkanci so preparati, ki jih pripravimo s pritiskom na rastlinsko tkivo, tako da dobimo eno plast celic. Po Feulgenu pobarvane vzorce rastlinskega tkiva smo za 5 do 15 minut prenesli v 45% očetno kislino, ki tkivo zmehča. Nato smo na predhodno očiščena in označena objektna stekla položili pobarvane vzorce in pod lupo odrezali približno 1 mm dolg košček v F1 regiji (0,5–1 mm nad koreninsko čepico). Orientirali smo se po oddaljenosti meristemske regije (zgostitev jeder) od koreninske čepice. Postopek priprave mečkancev je podrobno opisan v Dolenc Koce (2001).

Preparate, ki smo jih nameravali barvati z barvilom Fast Green, ki celične stene obarva modro-zeleno, smo po končanem postopku priprave mečkancev za 2 minuti potopili v absolutni etanol, nato pa za 2 minuti v barvilo Fast Green. Odvečno barvilo smo spirali v absolutnem etanolu 5–15 sekund in preparate sušili na zraku vsaj 30 minut. Na koncu smo vse preparate prekrili s krovnim sredstvom DPX (Fisons, VB) in krovnimi stekelci.

3.4.5 Štetje mikrojeder

Pred štetjem smo vse preparate kodirali. Beležili smo mikrojedra, fragmente in jedra v mitozih. Mitozni indeks (MI) smo izračunali na naslednji način:

$$MI = \text{število celic v mitozih} / \text{število vseh celic} \quad \dots(1)$$

Pri štetju smo si pomagali z makrom v Microsoftovem programu Excel, s katerim smo si zabeležili jedra, mikrojedra in mitoze. Program je sproti računal število mikrojeder na 1000

celic ter mitozni indeks. Poleg mikrojeder smo opazovali tudi druge oblike poškodbe DNA, kot so kromosomske aberacije (predvsem anafazni mostovi).

Šteli smo 1000 celic na preparat, razen pri poskusu 3, pri katerem smo na preparat šteli 2000 celic, saj smo na enem od začetnih vzorcev do 900. celice opazili 3 mikrojedra, od 900.–1000. celice pa smo jih našli kar 11.

3.4.6 Statistična analiza

Za izpostavitve posamezni koncentraciji smo uporabili tri čebule, od vsake čebule pa smo uporabili štiri korenine za pripravo preparatov. Število čebul in korenin, ki smo jih uporabili pri vsaki obdelavi, je prikazano v prilogi A.

Na preparat smo prešteli 1000–2000 jeder (celic). Iz povprečja vseh korenin ene obdelave smo izračunali povprečje mikrojeder na 1000 celic (MJ/1000 celic).

Uporabili smo standardne statistične metode s pomočjo programa GraphPad Prism. Za določitev statistično značilne razlike med obdelavo in kontrolo ter med posameznimi koncentracijami toksične snovi smo uporabili analizo variance (ANOVA s Tukeyevim post testom) in Studentov t-test.

4 REZULTATI

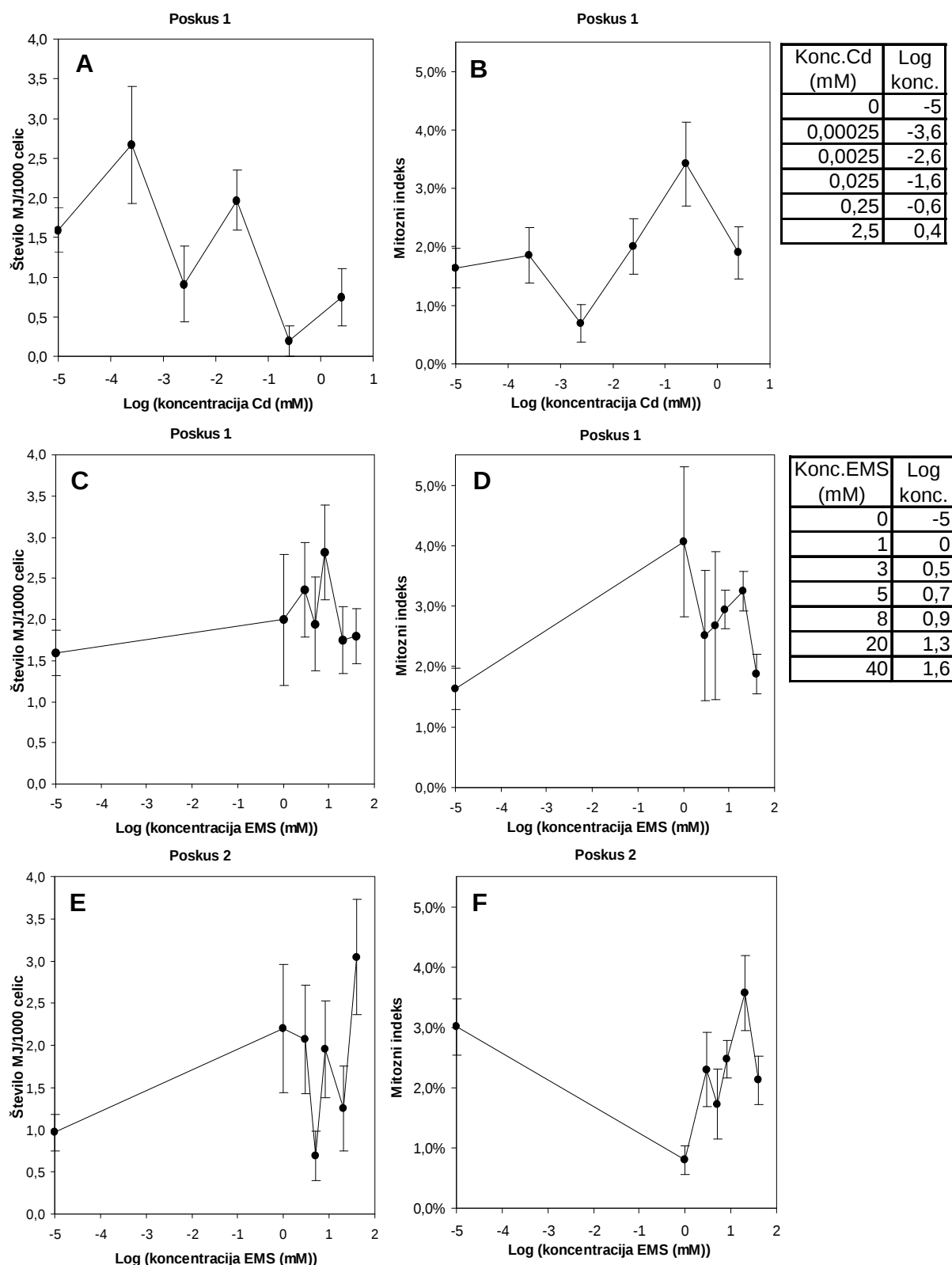
4.1 24-urna obdelava korenin s kadmijem in EMS (poskusa 1 in 2)

Pri poskusih 1 in 2 smo uvajali in preizkušali metodo mikro jeder ter prirejali postopek izvedbe poskusa. Pri poskusu 1 smo korenine čebule za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam kadmija (0,00025, 0,0025, 0,025, 0,25, 2,5, 10 mM) in EMS (1, 3, 5, 8, 20, 40 mM). Poskus 2 je bil ponovitev poskusa 1, pri čemer smo uporabili samo EMS.

Pri poskusu 1 je bilo povprečno število mikro jeder na 1000 celic v negativni kontroli 1,6 (sliki 6A in 6C). Pri obdelavi s kadmijem je bilo povprečno število mikro jeder na 1000 celic od 0,2 do 2,7 (slika 6A), pri obdelavi z EMS pa od 1,8 do 2,8 (slika 6C). Podobne rezultate smo dobili tudi pri poskusu 2, pri katerem je bilo povprečno število mikro jeder na 1000 celic v negativni kontroli 1,0 (slika 6E), pri obdelavi z različnimi koncentracijami EMS pa od 0,7 do 3,0 (slika 6E). Ob tem pri nobeni od obdelav nismo opazili pričakovanega koncentracijsko odvisnega odgovora (slike 6A, 6C in 6E). Pri obeh poskusih ni bilo statistično značilnih razlik med povprečnim številom mikro jeder na 1000 celic pri negativni kontroli in pri koreninah, obdelanih z različnimi koncentracijami toksičnih snovi (ANOVA s Tukeyevim post-testom, $p > 0,05$).

Pri poskusu 1 je bil mitozni indeks v negativni kontroli 1,6 % (sliki 6B in 6D). Pri obdelavi s kadmijem je bil mitozni indeks od 0,7 do 3,4 % (slika 6B), pri obdelavi z EMS pa od 1,9 do 4,0 % (slika 6D). Podobne rezultate smo dobili tudi pri poskusu 2, pri katerem je bil mitozni indeks v negativni kontroli 3,0 % (slika 6F), pri obdelavi z različnimi koncentracijami EMS pa od 0,8 do 3,6 % (slika 6F).

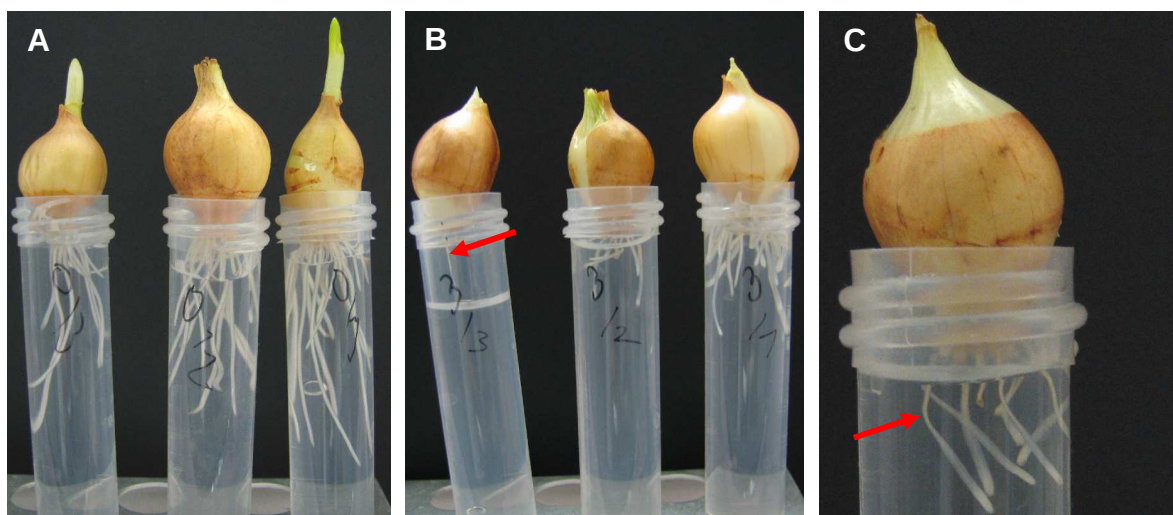
Pri poskusu 1 smo v mitoznem indeksu opazili statistično značilno razliko med 0,0025 mM in 0,25 mM koncentracijo kadmija ($p < 0,05$), pri poskusu 2 pa med negativno kontrolo (H_2O) in 1 mM koncentracijo EMS ($p < 0,01$) ter med 1 mM in 20 mM koncentracijo EMS ($p < 0,001$).



Slika 6. Število mikrojedr in mitozni indeks v koreninah čebul, izpostavljenih različnim koncentracijam kadmija (poskus 1) in EMS (poskusa 1 in 2). A, C, E – število mikrojedr (MJ); B, D, F – mitozni indeks. Za vsako obdelavo (koncentracijo toksične snovi) je prikazana povprečna vrednost za vse vzorčene korenine s standardno napako. Na osi x so koncentracije toksične snovi prikazane na logaritemski skali (negativna kontrola – voda je prikazana kot vrednost –5). Število korenin pri vsaki obdelavi je prikazano v prilogi A.

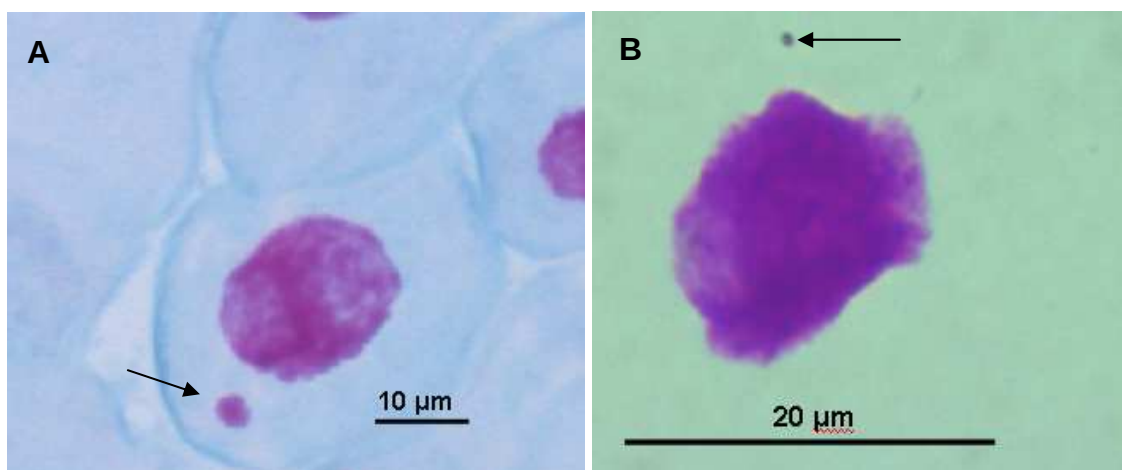
Pri izvedbi obeh poskusov smo naleteli na več težav. Tako je raztopina v nekaterih epruvetah hitreje izhlapevala kot v drugih; hitro izhlapevanje smo opazili pri epruvetah, pri katerih se čebula zaradi svoje nepravilne oblike ni dobro usedla v vrat epruvete. Zato so bile korenine nekaterih čebul na koncu vsake faze poskusa (rast korenin, izpostavitve, okrevanje) cele potopljene v raztopino, nekatere korenine so imele potopljene le vršičke, nekatere pa sploh niso bile več potopljene (slika 7B). Izsuševale so se predvsem krajše korenine. Pri poskusu 1 smo korenine pred izpostavitvijo dalj časa pustili na zraku (1 uro), tako da so kazale znake dehidracije (ovenelost, nagrbančenost) in nekateri vršički so bili rjavkasti. Po namakanju v vodi so si rastline vsaj na videz opomogle, zato smo poskus izvedli do konca. Na osnovi teh izkušenj smo pri nadaljnjih poskusih poskrbeli, da so bile korenine ob izpostavitvi daljše in ves čas poskusa potopljene v raztopini.

Pri čebulah, obdelanih z visokimi koncentracijami EMS (5–40 mM), so bili zgornji deli nekaterih korenin tanjši kot spodnji, korenine pa so bile upognjene (slika 7C). Tega nismo opazili pri negativni kontroli (slika 7A) in pri nizkih koncentracijah EMS (1–3 mM), kjer so bili zgornji in spodnji deli korenin približno enako debeli.



Slika 7. **Konec izpostavitve pri poskusu 2.** A – korenine negativne kontrole. B – v levi epruveti je zaradi oblike čebule raztopina hitro hlapela, zato ob koncu poskusa cela korenina ni bila več potopljena (puščica); 3 mM EMS. C – upognjene in stanjšane korenine v zgornjem delu (puščica); 20 mM EMS.

Pri izvedbi poskusov 1 in 2 smo oblikovali tudi kriterije za štetje mikrojedr. Pri štetju tako nismo upoštevali zelo majhnih fragmentov DNA (slika 8B). Upoštevali smo mikrojedra, ki so imela premer od 1/10 do 1/3 interfaznega jedra (slika 8A).

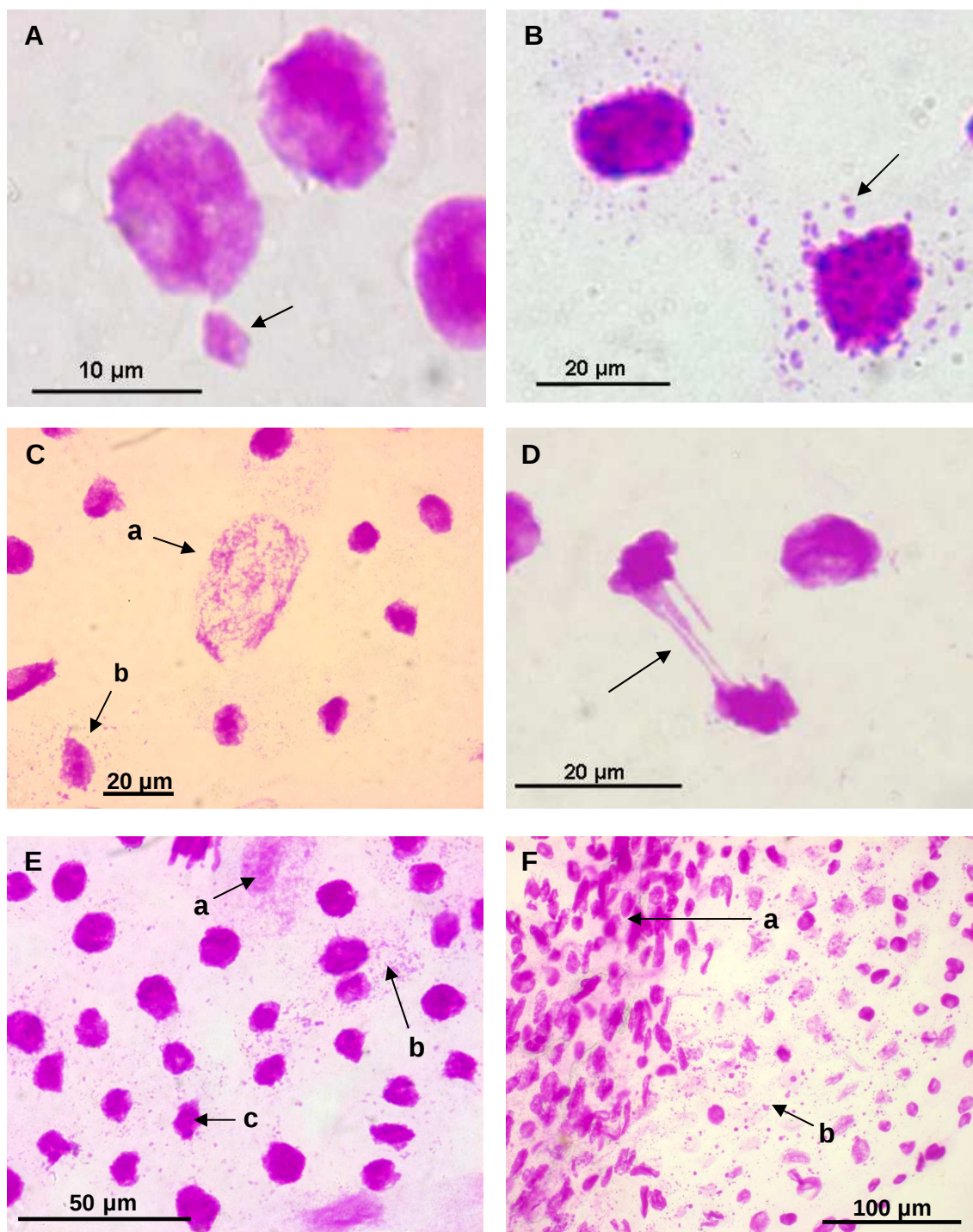


Slika 8. **Velikost mikro jeder.** A – dovolj veliko mikro jedro za upoštevanje pri štetju (puščica); B – premajhno »mikro jedro« (puščica). A in B – negativna kontrola (H_2O).

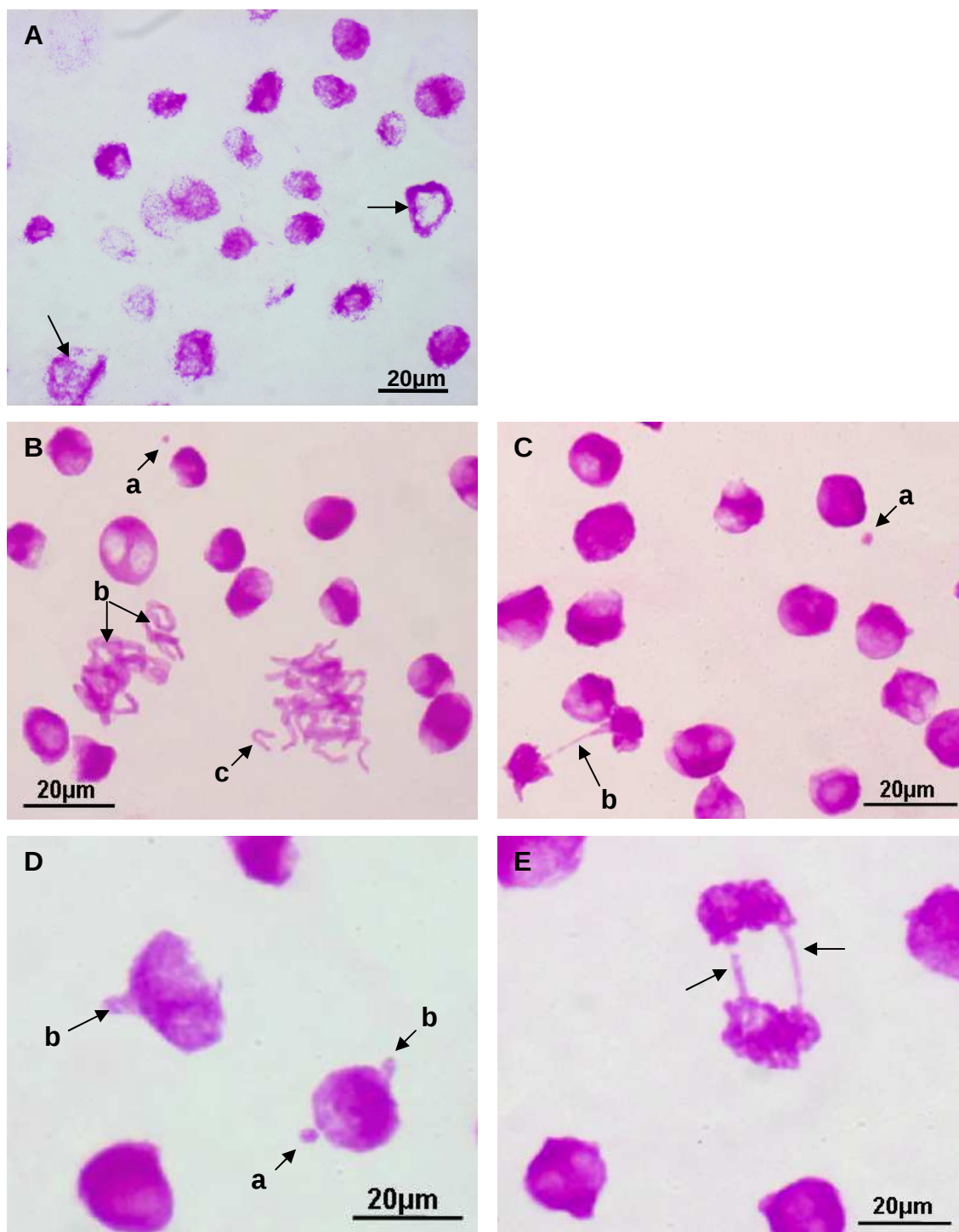
Kljub temu da pri obdelavi s toksičnimi snovmi pogostost mikro jeder ni bila značilno različna od negativne kontrole (slika 6, str. 20), smo pri preparatih poskusa 1 in 2 opazili številne nepravilnosti v primerjavi s preparati negativne kontrole. Preparati negativne kontrole so bili večinoma brez posebnosti, le pri treh preparatih smo opazili nekaj mikro jeder neovalnih oblik (slika 9A). Pri preparatih korenin, obdelanih z različnimi koncentracijami kadmija, so se nepravilnosti kazale kot obarvani fragmenti v citoplazmi (sliki 9E-b in 9F-b) ter kot jedra nepravilnih oblik (slika 9E-c). Pri obdelavi z najvišjo – 10 mM koncentracijo kadmija zaradi slabe kakovosti preparatov (številni obarvani fragmenti, neovalna oblika in neenakomerna obarvanost jeder, slabo ločevanje celic v enosloj) nismo mogli oceniti pogostosti mikro jeder na nobenem preparatu (sliki 9E in 9F). Pri preparatih korenin, obdelanih z različnimi koncentracijami EMS, smo opazili fragmente okoli jeder (slika 9B) in razpad jeder (slika 9C-a), a po večini so poškodovanost nakazovale kromosomske aberacije (slika 9D). Pri višjih koncentracijah EMS (5–40 mM) smo opazili tudi relativno veliko anafaznih mostov, vendar njihove pogostosti nismo kvantitativno vrednotili.

Preparati korenin, obdelanih z EMS pri poskusu 2, so kazali poškodbe jeder, kot so kromosomske aberacije (slike 10B, 10C, 10D in 10E) in razpadajoča jedra (slika 10A).

Razlike med preparati, obdelanimi s 40 mM EMS za 24 ur in 48 ur pri poskusu 2, nismo opazili. V obeh primerih smo opazili pojave, ki kažejo na poškodovanost dednine, tako kromosomske aberacije kot mikro jedra (sliki 10D in 10E).



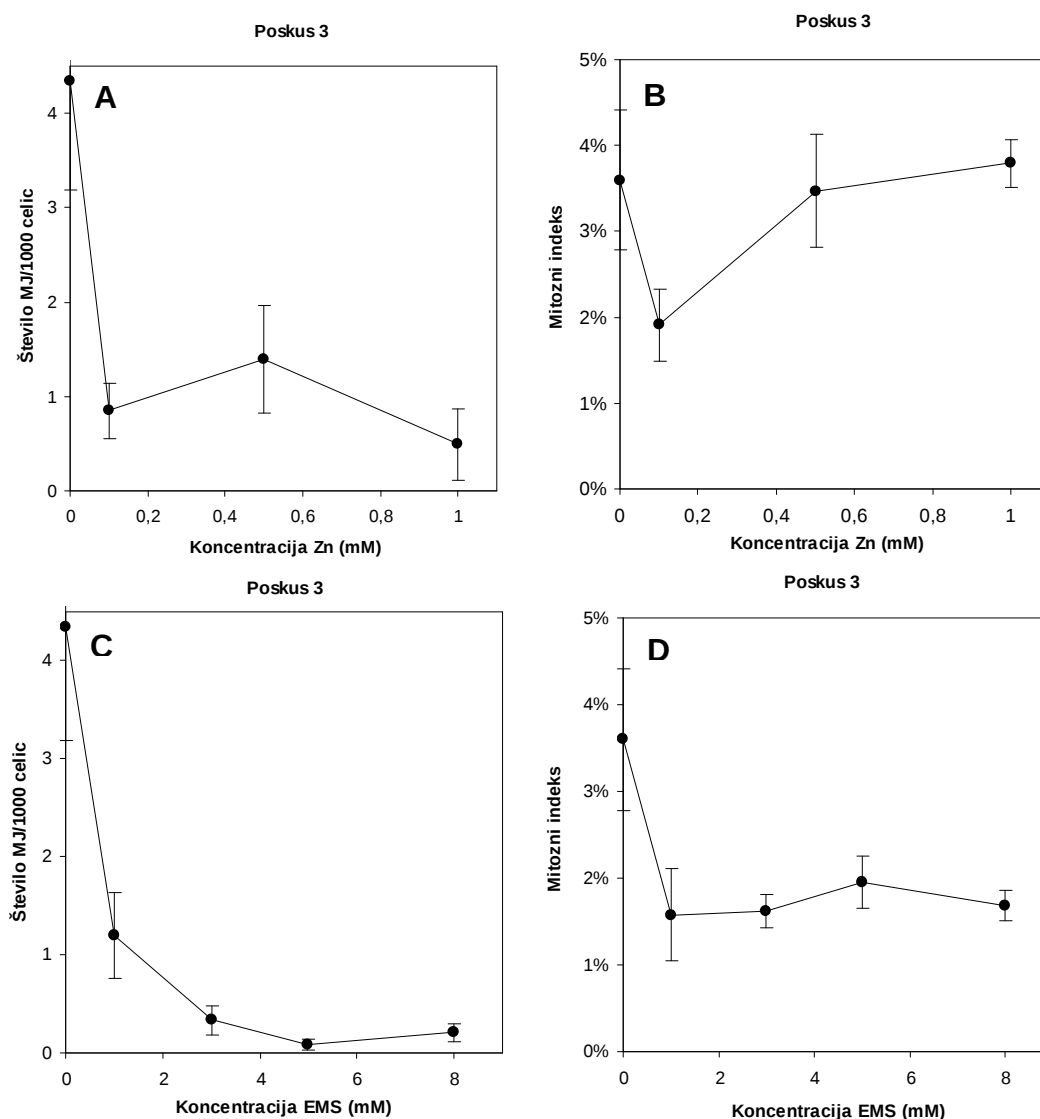
Slika 9. Vpliv EMS in kadmija na koreninske celice čebule pri poskusu 1. A – negativna kontrola. Puščica označuje mikrojedro z neovalnim robom; takšne oblike so tudi jedra. H₂O; B – fragmenti okoli jedra (puščica). 5 mM EMS; C – razpadajoče jedro (a) in obarvani fragmenti (b). 8 mM EMS; D – anafazni most. 20 mM EMS; E – razpadajoče jedro (a), fragmenti (b) in neovalna oblika jeder (c). 10 mM Cd; F – slabo ločevanje celic v enosloj (a) in fragmenti (b). 10 mM Cd.



Slika 10. Vpliv EMS na koreninske celice čebule pri poskusu 2. A – razpadajoči jedri (puščici); 1 mM EMS. B – mikrojedro (a) in kromosomske aberacije: razdvojena kromosomska masa (b) ter fragment ali kromosom (c). Puščica a označuje mikrojedro. 40 mM EMS; C – anafazni most (b). Puščica a označuje mikrojedro. 40 mM EMS; D – mikrojedro ob glavnem jedru (a) in kromosomska aberacija (b); 40 mM EMS, izpostavitvev 24 ur. E – puščici označujeta anafazni most; 40 mM EMS, izpostavitvev 48 ur.

4.2 24-urna obdelava korenin s cinkom in EMS (poskus 3)

Pri poskusu 3 smo metodo mikrojedr uporabili za obdelavo korenin s cinkom. Korenine čebule smo za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam cinka (0,1, 0,5, 1,0 mM), poskus z EMS pa je bil ponovitev poskusov 1 in 2, pri čemer smo uporabili le nizke koncentracije EMS iz prejšnjih poskusov (1, 3, 5, 8 mM).



Slika 11. Število mikrojedr in mitozni indeks v koreninah čebul, izpostavljenih različnim koncentracijam cinka in EMS (poskus 3). A, C – število mikrojedr (MJ); B, D – mitozni indeks. Za vsako obdelavo (koncentracijo toksične snovi) je prikazana povprečna vrednost za vse vzorčene korenine s standardno napako. Število korenin pri vsaki obdelavi je prikazano v prilogi A.

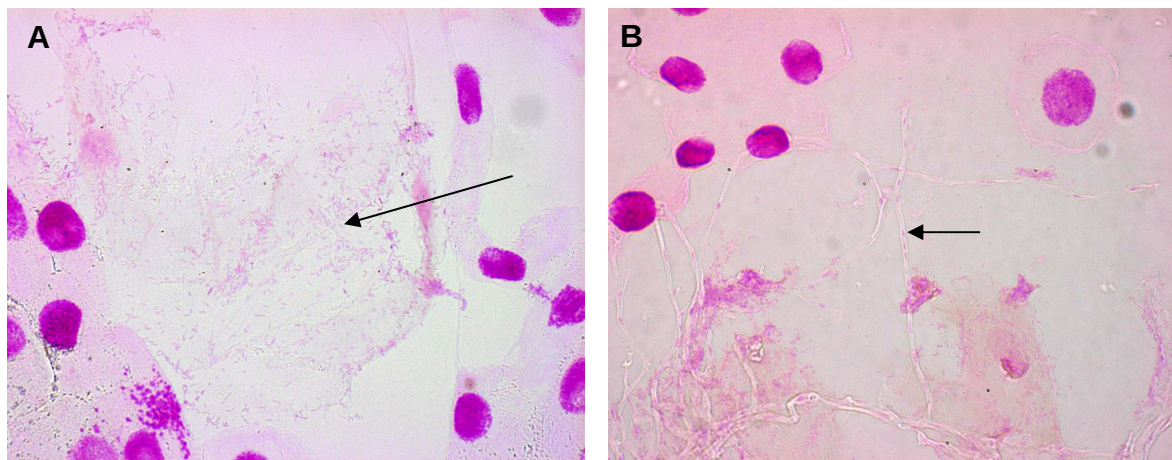
Pri poskusu 3 je imela negativna kontrola visoko število mikrojeder na 1000 celic (4,3 MJ/1000 celic, sliki 11A in 11C) glede na ostale poskuse (v povprečju 1 MJ/1000 celic). Pri obdelavi s cinkom in EMS je bila pogostost mikrojeder nizka. Pri vseh obdelavah s cinkom in EMS je bila pogostost mikrojeder statistično značilno različna od negativne kontrole (ANOVA s Tukeyevim post-testom; $p < 0,01$; sliki 11A in 11C). Edina izjema je bila obdelava z 0,5 mM raztopino Zn ($p > 0,05$). Pri obdelavi s cinkom je bilo povprečno število mikrojeder na 1000 celic od 0,5 do 1,4 (slika 11A), pri obdelavi z EMS pa od 0,1 do 1,2 (slika 11C). Ob tem pri nobeni od obdelav nismo opazili pričakovanega koncentracijsko odvisnega odgovora (sliki 11A in 11C).

Mitozni indeks v negativni kontroli je bil 3,6 % (sliki 11B in 11D) in se statistično značilno ni razlikoval od mitoznega indeksa pri obdelavi z različnimi koncentracijami cinka, kjer je bila njegova vrednost od 1,9 do 3,8 % (slika 11B). Pri vseh koncentracijah EMS, razen pri 5 mM EMS, je bil mitozni indeks statistično značilno različen od negativne kontrole ($p < 0,05$). Vrednosti mitoznega indeksa pri različnih koncentracijah EMS so bile od 1,6 do 2,0 % (slika 11D).

Pri vseh čebulah smo po obdelavi opazili močno zasluzenost koreninskih vršičkov, tudi pri negativni kontroli. Že pri najnižji koncentraciji cinka (0,1 mM) smo v primerjavi z negativno kontrolo opazili stanjšanje celotne korenine ali upogibanje in stanjšanje zgornjih delov nekaterih korenin v primerjavi s spodnjimi (podobno kot pri poskusu 1 – slika 7C, str. 21). Nekatero korenino so se prelomile med prenosom iz ene raztopine v drugo. Pri višjih koncentracijah cinka (0,5 in 1,0 mM) je bilo stanje podobno kot pri 0,1 mM koncentraciji.

Korenine, obdelane z EMS, so bile v primerjavi z negativno kontrolo tanjše po celotni dolžini. Pri višjih koncentracijah EMS (5 in 8 mM) so bile nekatere korenine v zgornjem delu debele in turgidne, približno na polovici pa vidno stanjšane ter so se prelomile, ko smo jih prenesli iz ene raztopine v drugo.

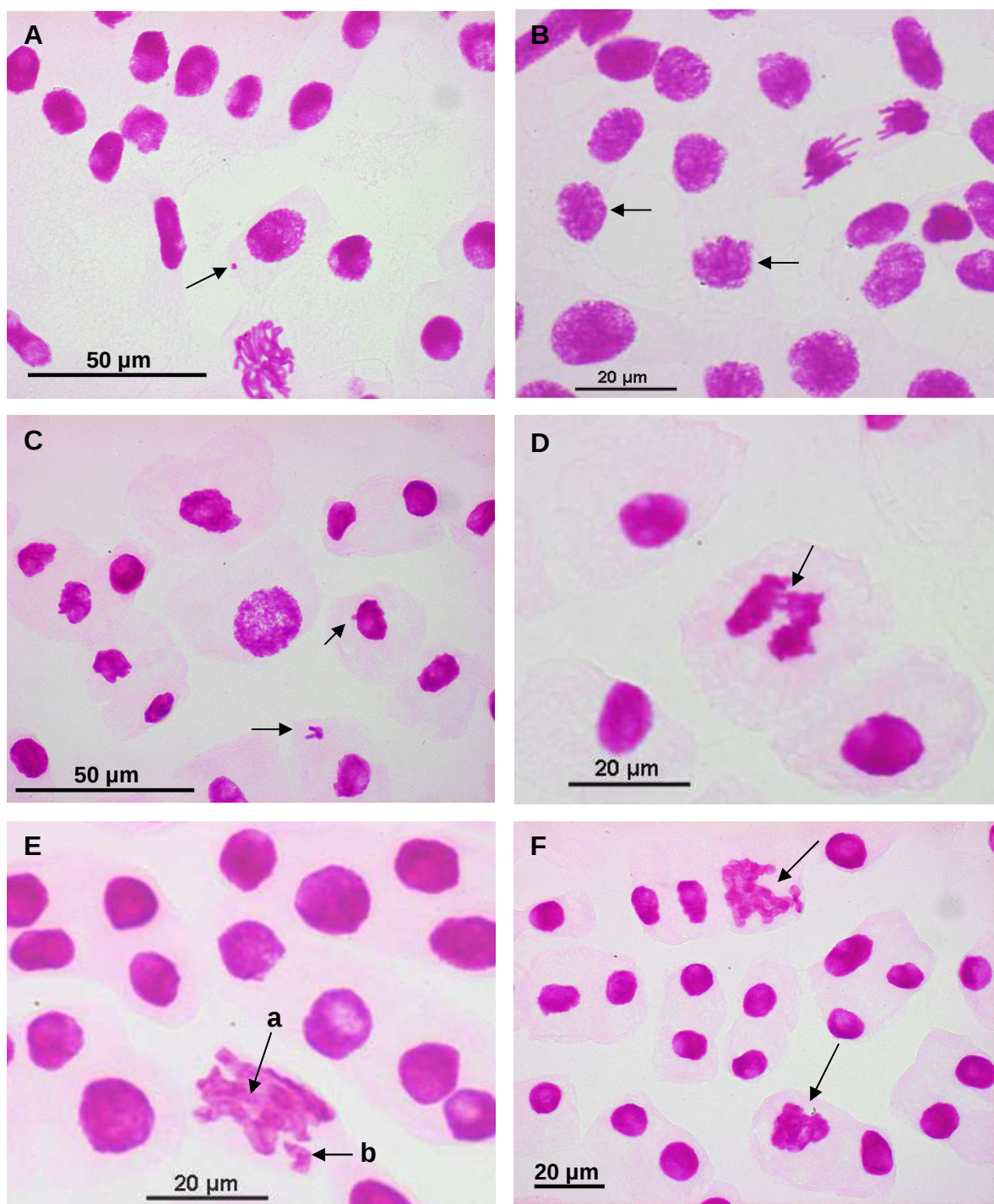
Na nekaterih preparatih smo opazili večja svetlo rožnato obarvana območja, ki so vsebovala veliko zelo drobnih obarvanih »delcev« (sliki 12A in 12B). Možno je, da so ta območja vsebovala veliko bakterij v sluzi. V tem primeru bi lahko bila rožnata obarvanost posledica barvanja bakterijske DNA. Opazili smo tudi podolgovate strukture z rožnatimi ovali, ki so bile verjetno hife gliv z jedri (slika 12B).



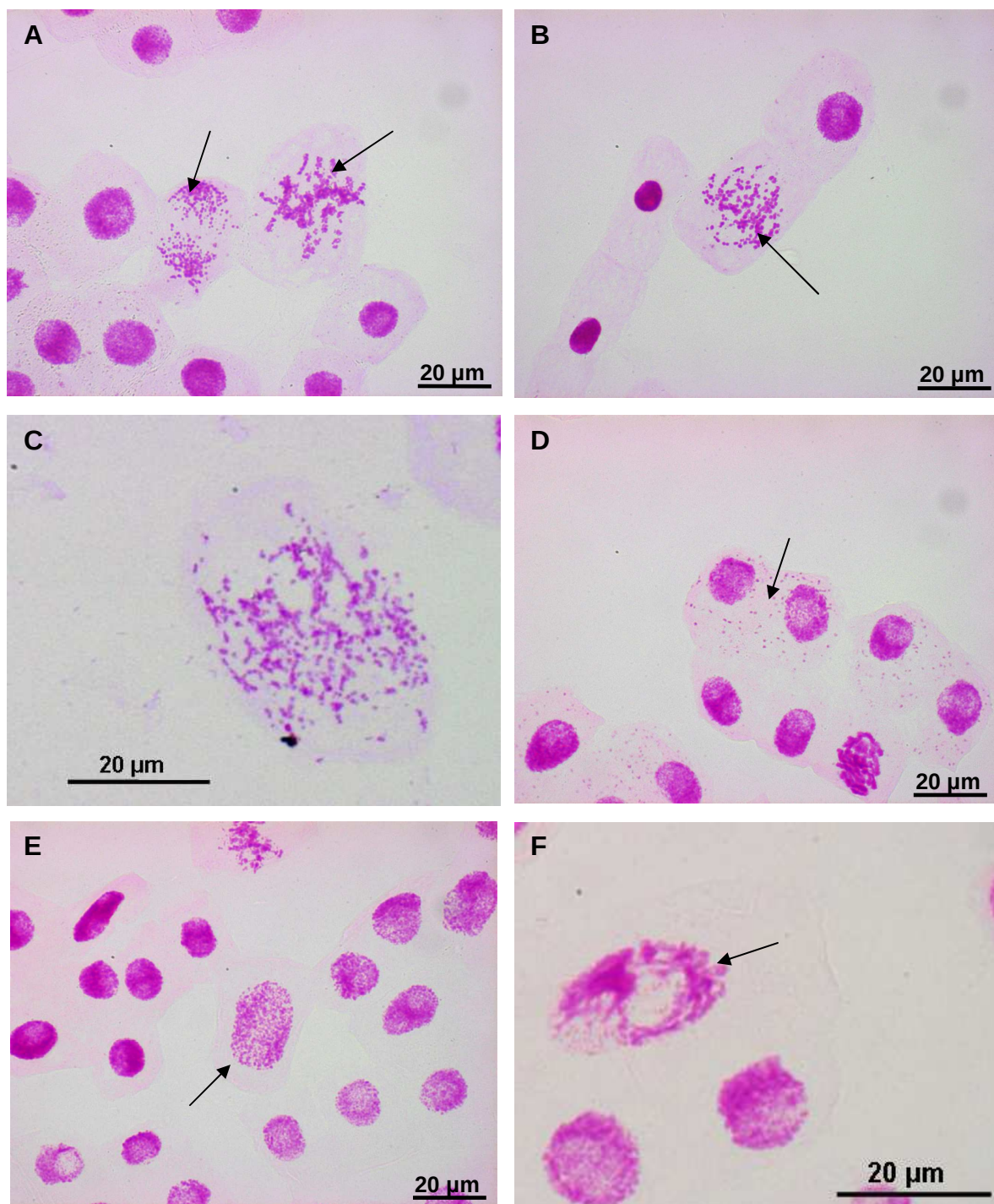
Slika 12. Neobičajne strukture na preparatih pri poskusu 3. A – puščica označuje območje, ki bi lahko vsebovalo sluz z bakterijami; 0,5 mM Zn. B – podolgovate prozorne strukture so najverjetneje glivne hife, rožnati ovali pa njihova jedra (puščica); 0,1 mM Zn.

Pri negativni kontroli smo opazili nekaj kromosomskih aberacij, predvsem anafazne mostove in veliko mikrojeder (slika 13A). Pri preparatih, obdelanih z EMS, smo opazili veliko sprememb jeder, kot so neovalna oblika jeder (slika 13B), svetlejše obarvana jedra in veliko anafaznih mostov, ki jih je bilo več z naraščanjem koncentracije (slika 13D). Opazili smo tudi druge kromosomske aberacije (slike 13C, 13E in 13 F).

Samo pri obdelavi s cinkom smo opazili posebno poškodbo kromosomov v mitozii. Ti so bili v mnogih celicah videti kot ogrlica iz koral – na »navidezni niti« je bilo veliko kroglastih močno obarvanih segmentov (slike 14A in 14B). Cinkove preparate smo prepoznali že na oko, še pred dešifriranjem. Pri koreninah, obdelanih s cinkom, je bilo mnogo jeder v interfazi zelo šibko obarvanih in večjih od običajnih jeder v interfazi (slika 14E). V citoplazmi celic smo opazili veliko fragmentov (slika 14D) in nekaj razpadajočih jeder (slike 14C in 14F).



Slika 13. Vpliv EMS na koreninske celice čebule pri poskusu 3. A – negativna kontrola. Puščica označuje mikrojedro. H₂O; B – jedra neovalnih oblik (puščici). 1 mM EMS; C – puščici označujeta kromosomske aberacije. 3 mM EMS; D – zlepljena kromosomska masa z anafaznim mostom (puščica). 3 mM EMS; E – kromosomska aberacija – kromosomi niso poravnani v ekvatorialni ravnini (a), z osamljenim kromosomom oz. fragmentom (b). 3 mM EMS; F – zlepljena kromosomska masa (puščici). 3 mM EMS.



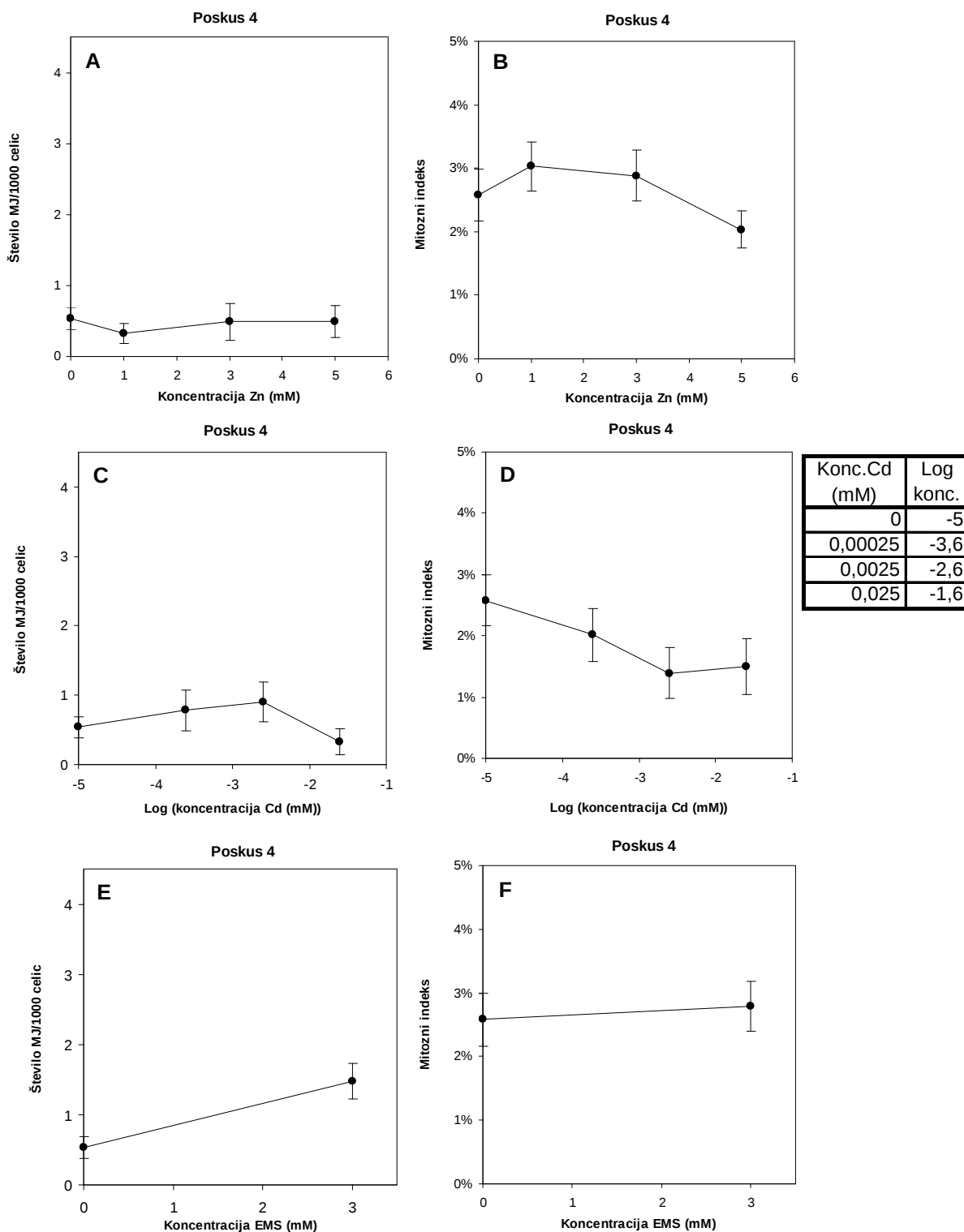
Slika 14. Vpliv cinka na koreninske celice čebule pri poskusu 3. A, B – puščice označujejo nenavadno strukturo kromosomov (»izgled ogrlice«). 1 mM Zn; C – razpad jedra. 1 mM Zn; D – fragmenti v celici (puščica). 0,5 mM Zn; E – zelo veliko jedro (puščica). 0,5 mM Zn; F – neobičajno jedro. 0,1 mM Zn.

4.3 2-urna obdelava korenin s cinkom, kadmijem in EMS (poskus 4)

Pri poskusu 4 smo test mikrojeder izvajali s krajšim časom izpostavitve. Zaradi tega smo povečali koncentracije cinka (1, 3, 5 mM). Ponovno smo proučevali vpliv kadmija na celice čebule, pri čemer smo uporabili le nižje koncentracije kadmija (0,00025, 0,0025, 0,025 mM). Kot negativno kontrolo smo uporabili H₂O, kot pozitivno kontrolo pa 3 mM EMS.

Povprečno število mikrojeder na 1000 celic v negativni kontroli je bilo 0,5 (slike 15A, 15C in 15E). Pri obdelavi s cinkom je bilo povprečno število mikrojeder na 1000 celic od 0,3 do 0,5 (slika 15A), pri obdelavi s kadmijem od 0,3 do 0,9 (slika 15C) in pri obdelavi z EMS 1,3 (slika 15E). Ob tem pri nobeni od obdelav s cinkom in kadmijem nismo opazili pričakovanega koncentracijsko odvisnega odgovora (sliki 15A in 15C). Med negativno kontrolo in obdelavami s cinkom in kadmijem nismo opazili statistično značilnih razlik v pogostosti mikrojeder (ANOVA s Tukeyevim post-testom, $p > 0,05$). Statistično značilno višjo pogostost mikrojeder pa smo opazili med negativno kontrolo in obdelavo s 3 mM EMS (ANOVA s Tukeyevim post-testom, $p < 0,05$).

Mitozni indeks v negativni kontroli je bil 2,6 % (slike 15B, 15D in 15F). Pri obdelavi s cinkom je bil mitozni indeks od 2,0 do 3,0 % (slika 15B), pri obdelavi s kadmijem od 1,4 do 2,0 % (slika 15D), pri obdelavi z EMS, pa 2,8 % (slika 15F). Med mitoznim indeksom pri negativni kontroli in pri koreninah, obdelanih z različnimi koncentracijami cinka, kadmija in EMS, nismo opazili statistično značilnih razlik (ANOVA s Tukeyevim post-testom, $p > 0,05$).



Slika 15. Število mikrojedr in mitozni indeks v koreninah čebul, izpostavljenih različnim koncentracijam cinka, kadmija in EMS (poskus 4). A, C, E – število mikrojedr (MJ); B, D, F – mitozni indeks. Za vsako obdelavo (koncentracijo toksične snovi) je prikazana povprečna vrednost za vse vzorčene korenine s standardno napako. Na osi x so koncentracije kadmija prikazane na logaritemski skali (negativna kontrola – voda je prikazana kot vrednost -5). Število korenin pri vsaki obdelavi je prikazano v prilogi A.

Pri poskusu 4 smo ocenili spremembo rasti korenin od začetka izpostavitve toksičnim snovem do konca poskusa (okrevanja). Pri negativni kontroli smo pri vseh koreninah zabeležili rast od 3 do 5 mm.

Pri 1 mM koncentraciji cinka smo samo pri nekaj koreninah opazili rast do 2 mm, nekatere so se celo »skrčile« oz. skrajšale. Pri 3 mM koncentraciji cinka je bila rast do 1 mm, večina korenin ni nič zrasla. Pri 5 mM koncentraciji cinka je le ena korenina zrasla za 0,5 mm, druge niso nič zrasle.

Pri 0,00025 mM koncentraciji kadmija je bila rast precejšnja (3–5 mm) pri vseh treh čebulah. Pri 0,0025 mM koncentraciji kadmija je večina korenin zrasla od 3 do 5 mm, nekaj korenin pa ni nič zraslo. Pri 0,025 mM koncentraciji kadmija skoraj nobena korenina ni zrasla, le 2 korenini sta se podaljšali za 1 mm.

Korenine dveh čebul, ki so bile obdelane s 3 mM EMS, so zrasle od 2 do 3 mm, korenine tretje čebule so se podaljšale od 5 do 7 mm.

Pri vseh čebulah smo pred vzorčenjem opazili zaslužene vršičke, tudi pri negativni kontroli.

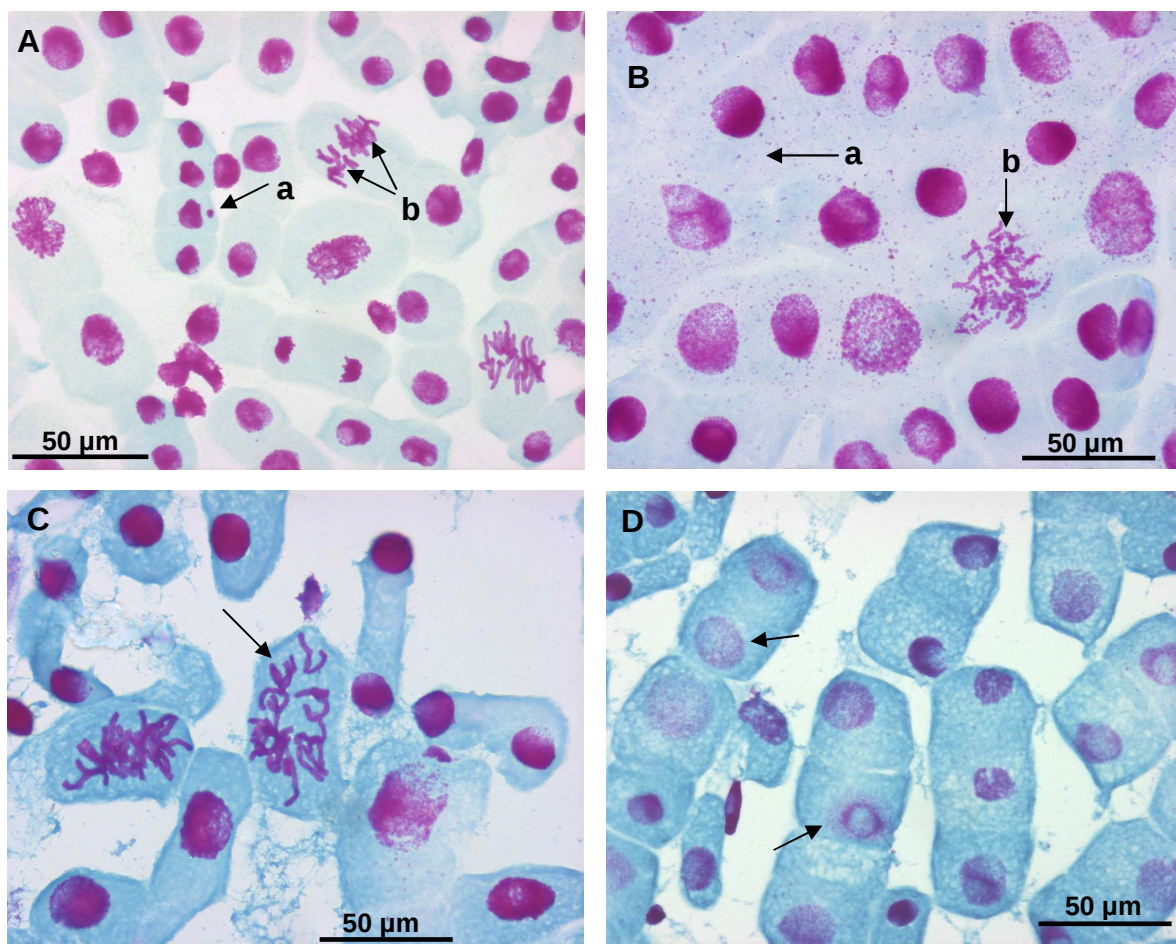
Pri poskusu 4 smo celične stene obarvali z barvilom Fast Green, zato so celice modrozeleno zelene barve. Ker smo tehniko barvanja uporabljali prvič, smo zaradi različno dolgega časa spiranja barvila s preparatov dobili različno intenziteto obarvanosti.

Pri negativni kontroli smo opazili nekaj mikrojeder in kromosomskih aberacij, a večinoma so bila jedra brez posebnosti (slika 16A).

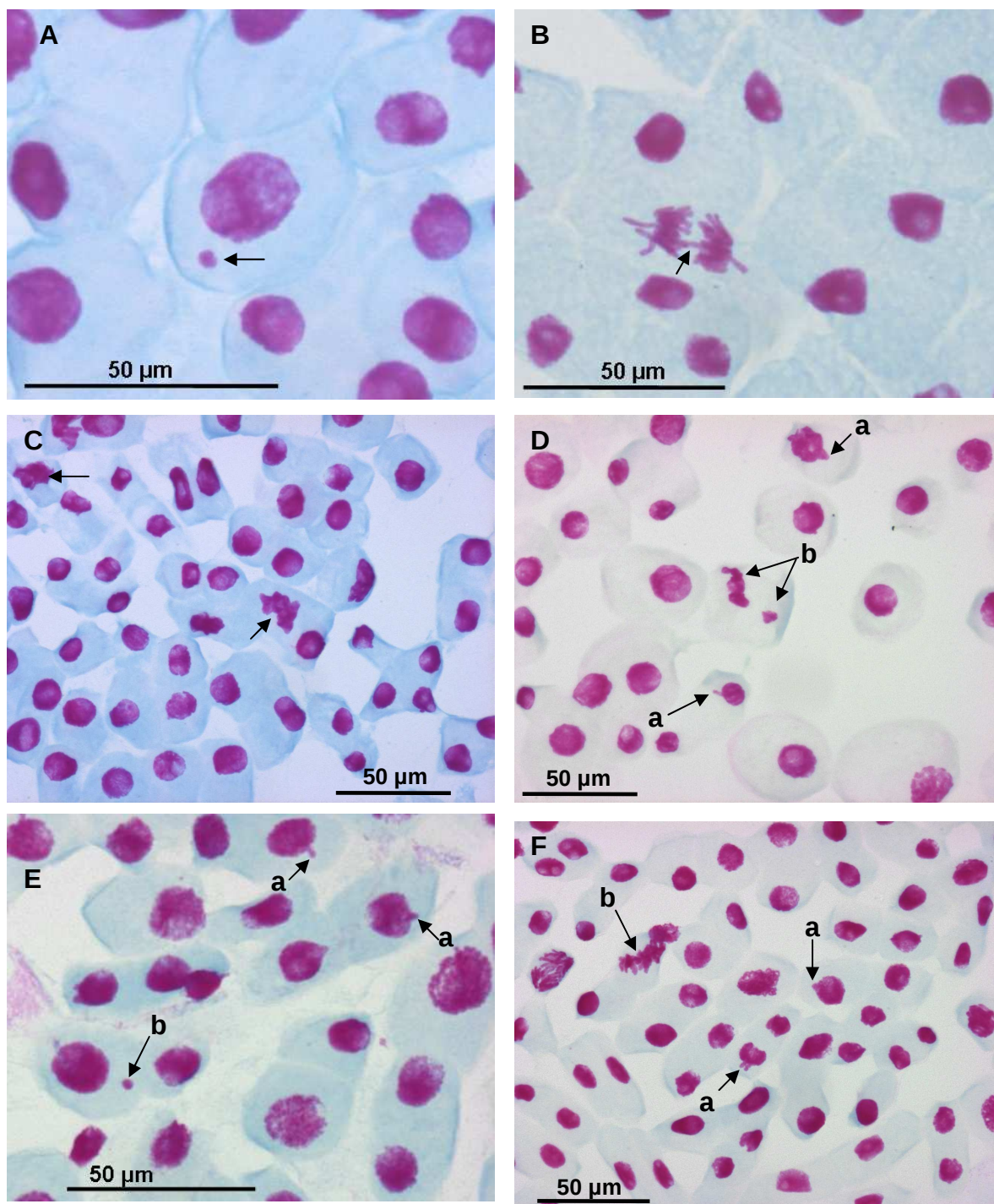
Že pri najnižji koncentraciji cinka (1 mM) smo prepoznali poškodbe, značilne za vpliv cinka na celice čebule (slika 16B). Pri tej koncentraciji smo opazili tudi svetlejša in povečana jedra (slika 16D). Opazili smo kromosomske aberacije (slika 16C). Podobne spremembe smo opazili tudi pri 3 in 5 mM koncentraciji cinka.

Pri nižjih koncentracijah kadmija (0,00025 in 0,0025 mM) so bili preparati brez posebnosti. Redko smo opazili povečana jedra nenavadnih oblik. Tudi pri najvišji (0,025 mM) koncentraciji kadmija so bili preparati večinoma brez posebnosti, pri nekaterih smo opazili nenavadne mitoze in anafazne mostove. Pri vseh treh koncentracijah so se pojavljale kromosomske aberacije (slike 17B, 17C in 17 D), največ smo jih opazili pri 0,025 mM koncentraciji kadmija. Nekaj je bilo tudi mikrojeder (slika 17A).

Preparati EMS so bili večinoma brez posebnosti. Opazili smo kromosomske aberacije (sliki 17E in 17F).



Slika 16. **Vpliv cinka na koreninske celice čebule pri poskusu 4.** A – negativna kontrola. Puščica a označuje mikrojedro, puščica b označuje kromosomsko aberacijo, kjer je kromosomska masa razdeljena na dva dela; H₂O. B – fragmenti (a), značilno jedro v mitози po obdelavi s cinkom – izgled ogrlice (b); 1,0 mM Zn. C – vsa jedra v mitози pri cinku nimajo izgleda »ogrlice iz korald«. Puščica označuje kromosomsko aberacijo; 1,0 mM Zn. D – puščici označujeta povečani in svetlejši jedri; 1,0 mM Zn.



Slika 17. **Vpliv kadmija in EMS na koreninske celice čebule pri poskusu 4.** A – puščica označuje mikrojedro; 0,025 mM Cd. B – puščica označuje anafazni most; 0,00025 mM Cd. C – zlepljanje kromosomov – kromosomska aberacija (puščici); 0,025 mM Cd. D – kromosomske aberacije: a – nepravilno despiraliziran kromosom, b – zlepljena in razdvojena kromosomska masa; 0,025 mM Cd. E – kromosomska aberacija (a) in mikrojedro (b); 3 mM EMS. F – kromosomske aberacije: a – nepravilno despiraliziran kromosom, b – zlepljena kromosomska masa; 3 mM EMS.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

Pri poskusih, ki smo jih opravili, nismo opazili pričakovane višje pogostosti mikrojeder po obdelavi korenin s toksičnimi snovmi v primerjavi z negativno kontrolo. Statistično značilno razliko v pogostosti mikrojeder med obdelavami in negativno kontrolo smo opazili samo pri poskusu 3, pri katerem smo dobili nenavadno visoko pogostost mikrojeder pri negativni kontroli in pri poskusu 4 po obdelavi z EMS. Pri nobenem poskusu nismo opazili koncentracijsko odvisnega odgovora.

Med izvajanjem poskusov 1 in 2 je prišlo do napak, na katere nismo bili pozorni, a bi lahko vplivale na rezultate. To je bil predvsem nizek nivo raztopin, ki je lahko povzročil dodatno poškodbo korenin, ki niso bile popolnoma potopljene. Na osnovi podatkov poskusa 1 in 2 smo izdelali bolj natančen protokol za nadaljnje poskuse.

Pri poskusu 3 je bila pogostost mikrojeder pri negativni kontroli statistično značilno višja kot pri negativnih kontrolah ostalih poskusov. Vzroka za visoko pogostost mikrojeder pri negativni kontroli si nismo znali razložiti, predvsem zato, ker smo na isti seriji čebul izvajali tudi poskus 4, pri katerem tako visoke pogostosti mikrojeder pri negativni kontroli ni bilo. Med poskusoma je preteklo 3 mesece, čebule pa so bile v času med poskusoma spravljene v hladilniku. Edina razlika med poskusoma je bila ta, da smo pri poskusu 3 prešteli dvakrat več celic kot pri poskusu 4. Morda bi za zanesljivejšo oceno pogostosti mikrojeder morali vedno šteti več kot 1000 celic na preparat. Pri negativni kontroli poskusov 3 in 4 smo opazili nekaj kromosomskih aberacij in precej zaslužene korenine.

5.1.1 Obdelava z EMS

Pri obdelavi z EMS smo pri različnih poskusih dobili različne pogostosti mikrojeder glede na negativno kontrolo. Pri poskusu 4, pri katerem smo korenine 3 mM koncentraciji EMS izpostavljali 2 uri, je bila pogostost mikrojeder statistično značilno višja od kontrole ($p < 0,05$; slika 15E, str. 31), vrednosti mitoznega indeksa pa so bile pri obeh obdelavah zelo

podobne ($p > 0,05$; slika 15F, str. 31). Rast korenin, obdelanih s 3 mM EMS, je bila podobna kot pri negativni kontroli. Glede na mitozni indeks in pojav mikro jeder lahko sklepamo, da koncentracija EMS ni bila tako visoka (oz. čas izpostavitve ni bil predolg), da bi vplivala na delitve celic, bila pa je dovolj visoka, da je EMS vplival na povišanje frekvence mikro jeder. EMS so uspešno uporabljali kot pozitivno kontrolo pri testu mikro jeder in testu kromosomskih aberacij tudi Mouchet in sod. (2005). Ugotovili so, da EMS vpliva na povišanje frekvence mikro jeder in prelomov DNA v eritrocitih larv navadne krempljarke (*Xenopus laevis*). Rank in Nielsen (1997) pa sta ugotovila, da je EMS mutagen in da povzroča pojav kromosomskih aberacij pri čebuli.

Pri poskusu 3, pri katerem smo korenine z EMS obdelovali 24 ur, sta bila pogostost mikro jeder in mitozni indeks večinoma statistično značilno nižja od negativne kontrole ($p < 0,05$; sliki 11C in 11D, str. 25). Pri koreninah, obdelanih z EMS, smo opazili povečan pojav kromosomskih aberacij, predvsem anafaznih mostov (slika 13, str. 28), in stanjšane korenin po celotni dolžini. Možno je, da je pri obdelavah z EMS prišlo do mitoznega zaostanka (zmanjšan mitozni indeks), ki zavira nastajanje mikro jeder. V primeru mitoznega zaostanka se namreč pojavi višja frekvenca anafaznih mostov, zaradi česar je treba poskus ponoviti in podaljšati čas okrevanja ali spremeniti koncentracijo in čas izpostavitve (Majer in sod., 2003; Fras in Maluszynska, 2003). Na osnovi teh opazovanj lahko domnevamo, da je bila koncentracija EMS pri poskusu 3 previsoka oz. čas izpostavitve predolg, da bi mikro jedra lahko nastala.

Tudi pri poskusih 1 in 2 smo korenine z EMS obdelovali 24 ur, a se pogostost mikro jeder in mitozni indeks od negativne kontrole v veliki večini nista statistično značilno razlikovala ($p > 0,05$; slike 6C–F str. 20). Kljub temu da test mikro jeder pri poskusih 1 in 2 po obdelavi z EMS ni pokazal razlik v primerjavi z negativno kontrolo, smo pri obdelavah z EMS opazili veliko kromosomskih aberacij (slika 9D, str. 23 in slike 10B–E, str. 24), ki kažejo na poškodbe DNA. Poleg tega smo opazili še druge spremembe jeder (sliki 9B in 9C, str. 23 in slika 10A, str. 24) ter stanjšanje in zvijanje korenin (slika 7, str. 21), kar bi lahko bila tudi posledica izsuševanja korenin zaradi upada nivoja vode oz. raztopin.

5.1.2 Obdelava s cinkom

Cink pri nobenem poskusu (3 in 4) ni povzročil razlik v mitoznem indeksu glede na negativno kontrolo ($p > 0,05$; slika 11B, str. 25 in slika 15B, str. 31). Pri poskusu 4 (2-urna obdelava) razlik v pogostosti mikro jeder med obdelavami in negativno kontrolo nismo opazili ($p > 0,05$; slika 15A, str. 31), pri poskusu 3 (24-urna obdelava) pa smo opazili visoko pogostost mikro jeder pri negativni kontroli, ki je bila statistično značilno višja kot pri večini obdelav s cinkom ($p < 0,05$; slika 11A, str. 25). Pogostost mikro jeder pri negativni kontroli poskusa 3 je bila statistično značilno višja od negativnih kontrol ostalih poskusov.

Pri obeh poskusih smo opazili posebne spremembe jeder po obdelavi s cinkom (drugačne kot pri EMS in kadmiju) in velik vpliv na rast korenin (inhibicija rasti). Za cink značilne spremembe jeder so se izrazile kot svetlejša in večja jedra s prazninami – t. i. redka jedra (slika 14E, str. 29), majhni fragmenti v citoplazmi (slika 14D, str. 29) in kromosomi v mitozih, ki so v večini celic izgledali kot ogrlica iz koral (sliki 14A in 14B, str. 29). Velika poškodovanost jeder v nekaterih vzorcih (veliko fragmentov okoli jeder – slika 14D, str. 29) je lahko vplivala tudi na zanesljivost ocene pogostosti mikro jeder pri poskusih 3 in 4.

Deknadt in sod. (1978) so pri poskusih na človeških limfocitih opazili, da cinkov klorid lahko razbije ali lomi kromosome. Najpogostejša kromosomska aberacija je bila prisotnost kromosomskih fragmentov, kar smo v veliki meri opazili tudi pri naših raziskavah. Že pri manjših koncentracijah cinka in krajšem času izpostavitve, kot so ga imeli Steinkellner in sod. (1998), smo zasledili zmanjšanje rasti korenin in poškodbe jeder, ki jih noben avtor razpoložljive literature o vplivu cinka na rastlinske celice ni omenjal. Steinkellner in sod. (1998) so celo zasledili koncentracijsko odvisen odgovor v razponu od 0–1000 mM koncentracije cinka. Francis in sod. (1995), ki so proučevali vpliv cinka na celični cikel pri celični suspenziji tobaka, so odkrili, da določena koncentracija cinka vpliva na zmanjšanje celičnih delitev. Morda je ustavljena rast korenin čebule po obdelavi s cinkom pri poskusih 3 in 4 posledica prekinitve celičnega cikla zaradi vpliva cinka. Fusconi in sod. (2006) namreč navajajo, da je upočasnjena rast korenin povezana tudi s spremenjeno aktivnostjo apikalnega meristema.

5.1.3 Obdelava s kadmijem

Pri obdelavah s kadmijem (poskusa 1 in 4) razlik v pogostosti mikrojeder in v mitoznem indeksu v primerjavi z negativno kontrolo nismo opazili ($p > 0,05$; slike 6A, 6B, str. 20 in 15C, 15D, str. 31). Pri poskusu 4, pri katerem smo korenine čebule kadmiju izpostavljali 2 uri, smo pri najvišji koncentraciji kadmija (0,025 mM) opazili zmanjšano rast korenin v primerjavi z negativno kontrolo. Nižji koncentraciji kadmija (0,00025 in 0,0025 mM) nista vplivali na rast korenin. Pri vseh treh koncentracijah kadmija (poskus 4) smo opazili kromosomske aberacije (slike 17B, 17C in 17D, str. 34), ki so bile pri najvišji koncentraciji kadmija najpogostejše. Ker ob pojavu kromosomskih aberacij nismo opazili povečanega števila mikrojeder, lahko sklepamo, da je prišlo do mitoznega zaostanka. Za oblikovanje mikrojeder bi v takem primeru morali podaljšati čas okrevanja, kot to predlagajo Majer in sod. (2003). Naše ugotovitve se ujemajo z ugotovitvami, da povišana koncentracija kadmija (1 mM in 10 mM, čas izpostavitve korenin 48 in 72 ur) inhibira rast korenin čebule (Liu in Kottke, 2004) in povzroči kromosomske aberacije v koreninskih celicah česna (Ünyayar in sod., 2006; Liu in sod., 2003/2004). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Fusconi in sod. (2006) s proučevanjem vpliva kadmija na rast korenin in mitozno aktivnost koreninskih meristemskih celic navadnega graha pri 24- in 48-urni izpostavitvi. Ugotovili so, da nizke koncentracije kadmija (0,00025, 0,0005 in 0,001 mM) niso vplivale na mitozno aktivnost, a so povzročile kromosomske aberacije (pretežno zlepljene metafazne kromosome in anafazne mostove), ki so naraščale s koncentracijami kadmija. Srednje visoke koncentracije kadmija (0,0025 in 0,025 mM) so povzročile popolno ustavitev mitozne aktivnosti in upočasnitev rasti korenin, pri najvišji koncentraciji kadmija (0,25 mM) pa je bila rast korenin popolnoma ustavljena. Ugotovili so tudi, da z višanjem koncentracije kadmija mitozni indeks pada.

Pri 24-urni obdelavi s kadmijem (poskus 1) smo uporabili mnogo višje koncentracije kadmija (0,00025–10 mM, preglednica 2, str. 15) kot pri poskusu 4. Pri poskusu 1 smo opazili veliko sprememb jeder – zmanjšana jedra, nepravilnih oblik, razpadajoča jedra (slika 9E, str. 23). Pri najvišji koncentraciji kadmija (10 mM) so bile spremembe jeder tako velike (sliki 9E in 9F, str. 23), da nismo mogli oceniti pogostosti mikrojeder pri nobenem preparatu. Verjetno smo pri poskusu 1 poleg predolgega časa izpostavitve uporabili tudi previsoke koncentracije kadmija, saj smo pri poskusu 4 ugotovili, da ima kadmij vpliv na rast korenin že pri manjši koncentraciji in času izpostavitve, kot smo jih večinoma imeli pri

poskusu 1. Naše domneve se skladajo z ugotovitvami Liu in sod. (2003/2004), da je vpliv kadmija odvisen tako od koncentracije kadmija kot tudi od časa izpostavitve kadmiju. Spremembe jeder, ki smo jih opazili pri poskusu 1, so verjetno posledica uporabe zelo visoke koncentracije kadmija in/ali posledica poškodb korenin zaradi napak pri izvedbi poskusa (poglavje 4.1, str. 21). Behboodi in Samadi (2004) sta namreč opazila, da čebula pri koncentracijah kadmija, višjih od 0,1 mM, ni razvila nobenih korenin. Liu in Kottke (2004) pa sta ugotovila, da pride pri višjih koncentracijah kadmija (1 mM in 10 mM, čas izpostavitve 48 ali 72 ur) do velikih strukturnih sprememb, ki vodijo v smrt večine celic, kar se izrazi v zaustavljeni rasti korenin.

5.1.4 Omejitve testa mikrojeder

Test mikrojeder pri večini poskusov ni pokazal poškodb DNA meristemskih celic korenin čebule, kljub očitnim spremembam oz. poškvdbam jeder. Pri obravnavi testa moramo upoštevati dejstvo, da je v izvedbo poskusov vključenih veliko parametrov (čas izpostavitve in okrevanja, koncentracija in vrsta toksične snovi), ki lahko vplivajo na rezultat. Verjetno smo samo pri obdelavi z EMS pri poskusu 4 izbrali primerne razmere za oblikovanje mikrojeder, saj je pogoj za oblikovanje mikrojeder tudi nemotena mitozna aktivnost celic. Na podlagi teh ugotovitev menimo, da je pri izvajanju testa mikrojeder zelo pomembna pravilna izbira vseh zgoraj navedenih dejavnikov, za kar je potrebna temeljita priprava serij uvodnih poskusov. Za celostno vrednotenje genotoksičnosti snovi so poleg ugotavljanja frekvence mikrojeder ključna tudi vsa opazovanja in beleženja sprememb rastline in celic (jeder).

Med omejitve testa mikrojeder spadajo tudi nejasni kriteriji za velikost mikrojeder. Ti so pri raziskavah rastlin praviloma povzeti po kriterijih za mikrojedra živalskih celic. Nekateri avtorji navajajo, da naj bi bila mikrojedra rastlinskih celic nekoliko večja od mikrojeder celic sesalcev (Majer in sod., 2003). Ker velikost mikrojeder rastlinskih celic ni jasno podana, smo jo določili na podlagi fotografij iz literature o mikrojedrih rastlinskih celic, predvsem celic čebule. Mikrojedra se od fragmentov DNA ločijo po tem, da so obdana z jedrno membrano, kar med drugim lahko ugotovimo po obliki mikrojedra (Majer in sod., 2003, glej poglavje Izvedba testa, str. 8, zadnji odstavek). Po našem mnenju bi bilo treba kriterije za mikrojedra preoblikovati in za mikrojedra šteti vsa izvenjedrna telesa

kromatinskega izvora, ki razen velikosti ustrezajo ostalim veljavnim kriterijem za mikrojedra. Treba je upoštevati tudi dejstvo, da gre pri določanju mikrojeder in mitoznega indeksa za podajanje subjektivnih ocen, zato je pomembno, da ocenjevanje opravi vedno ista oseba, ki si z izkušnjami izdelava enotne kriterije za ocenjevanje. Pri tem je še posebej pomembno kodiranje vzorcev.

Pri oceni mikrojeder rastlinskih celic bi morda lahko upoštevali tudi pojav programirane celične smrti, podobno kot pri živalskih celicah upoštevajo apoptozo kot mehanizem po katerem mikrojedra lahko nastanejo (Hedde in sod., 1991). Behboodi in Samadi (2004) sta namreč ugotovila, da kadmij povzroči spremembe koreninskih celic čebule, ki so podobne apoptozi pri živalskih celicah. Raziskava je pokazala, da visoke koncentracije kadmija lahko povzročijo tudi programirano celično smrt.

5.2 Sklepi

- Pri nobenem od poskusov po obdelavi s kovinami nismo opazili statistično značilnega povečanja pogostosti mikrojeder v primerjavi z negativno kontrolo.

- EMS je povzročil številne kromosomske aberacije, ki so se pogosteje pojavljale pri 24-urni izpostavitvi kot pri 2-urni. Pri obdelavi z višjimi koncentracijami EMS smo opazili večjo pogostost kromosomskih aberacij ter stanjšanje dela korenin in lomljenje korenin. Pri 2-urni izpostavitvi korenin 3 mM koncentraciji EMS smo verjetno izbrali primerne razmere za oblikovanje mikrojeder, saj je EMS vplival na povišanje frekvence mikrojeder, pri čemer mitozna aktivnost ni bila spremenjena.

- Vpliv cinka se je kazal v inhibiciji rasti korenin in v za cink značilnih spremembah jeder, ki so bile najbolj opazne pri kromosomih v mitozni – t. i. ogrlice iz korald.

- Kadmij je povzročil pojav kromosomskih aberacij, njihova pogostost je naraščala z naraščanjem koncentracij kadmija. Pri 0,025 mM koncentraciji in 2-urni izpostavitvi je vplival na inhibicijo rasti korenin.

- Pri izvajanju testa mikrojeder je pomembna pravilna izbira vseh treh dejavnikov (časa izpostavitve, koncentracije toksične snovi in časa okrevanja), za kar je potrebna temeljita priprava serij uvodnih poskusov. Za celostno vrednotenje genotoksičnosti snovi so poleg ugotavljanja frekvence mikrojeder ključna tudi vsa opazovanja in beleženja sprememb rastline in celic.

6 POVZETEK

Obremenjenost okolja s kovinami zaradi človekove dejavnosti narašča. Znano je, da nekatere kovine močno vplivajo na stabilnost ekosistemov in imajo lahko neugodne posledice tudi za človeka. Za relevantno ocenjevanje onesnaženosti okolja je treba izvajati tudi bioteste, ki nam lahko pokažejo biološko vlogo posameznih dejavnikov. Test mikrojeder je biotest, pri katerem opazujemo pojav mikrojeder, ki nastanejo zaradi poškodb DNA. Kadar te poškodbe povzroči določena snov, pravimo, da je snov genotoksična. V celicah genotoksična snov lahko povzroči zlome DNA (klastogenost) ali spremeni delovanje delitvenega vretena (aneugenost).

Z uporabo testa mikrojeder smo proučevali vpliv kovin kadmija in cinka ter etilmetansulfonata na koreninske meristemske celice čebule (*Allium cepa*). Cilj diplomskega dela je bil s testom mikrojeder ugotoviti genotoksičnost testnih snovi. Pričakovali smo višjo pogostost mikrojeder pri testnih snoveh v primerjavi z negativno kontrolo in koncentracijsko odvisni odgovor.

Test mikrojeder ni pokazal pričakovanih razlik med testnimi snovmi in negativno kontrolo. Kljub temu pa smo pri opazovanju jeder korenin, obdelanih s testnimi snovmi, opazili številne spremembe, kot so kromosomske aberacije in razpadanje jeder. Na podlagi teh opazovanj in priporočil nekaterih avtorjev, ki so se s podobnimi problemi že srečali, smo med raziskavo prilagajali protokole poskusov.

Pri skrajšanju časa izpostavitve s 24 ur na 2 uri smo pri obdelavi z nižano koncentracijo EMS opazili povečanje pogostosti mikrojeder v primerjavi z negativno kontrolo. EMS je povzročil kromosomske aberacije in pri 24-urni izpostavitvi povzročil stanjšanje in zvijanje korenin.

Cink je vplival na zmanjšanje rasti korenin in povzročil posebne spremembe jeder. Te spremembe so bile najbolj očitne pri kromosomih v mitози (ogrlice iz koralid).

Kadmij je pri določeni koncentraciji pri 2-urni izpostavitvi vplival na rast korenin in povzročil kromosomske aberacije, ki so se pogosteje pojavljale pri višjih koncentracijah.

Naši poskusi in podatki iz literature so pokazali, da je za ustrezno ugotavljanje genotoksičnosti s testom mikrojeder pomembna pravilna izbira vseh treh korakov poskusa (časa izpostavitve, koncentracije toksične snovi in časa okrevanja). Za celostno vrednotenje genotoksičnosti snovi je poleg ugotavljanja frekvence mikrojeder pomembno tudi opazovanje sprememb rastline in celic.

7 LITERATURA

- Alloway B. J., and Ayres, D. C. 1993. Chemical principles of environmental pollution, Chapman and Hall, Oxford: 3–15
- Aslanturk O. S., Celik T. A. 2005. Preventive effects of lycopene on chromosome aberrations in *Allium cepa*. Pakistan journal of biological sciences 8, 6: 482–486
- Bartsch H., Tomatis L. 1983. Comparison between carcinogenicity and mutagenicity based on chemicals evaluated in the IARC monographs. Environmental health perspectives, 47: 305–317
- Behboodi B. S., Samadi L. 2004. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. Plant Science, 167, 3: 411–416
- Bonnet M., Camares O., Veisseire P. 2000. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). Journal of experimental botany, 51, 346: 945–953
- Çelik A., Çavas T., Ergene-Gözükara S. 2003. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. Mutagenesis, 18, 5: 417–421
- Codina J. C., Pérez-Torrente C., Pérez-García A., Cazorla F. M., De Vicente A. 1995. Comparison of microbial tests for the detection of heavy metal genotoxicity. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 29, 2: 260–265
- Deknadt G., Deminatti M. 1978. Chromosome studies in human lymphocytes after in vitro exposure to metal salts. Toxicology 10: 67–75
- Dolenc Koce J. 2001. Ugotavljanje variabilnosti količine jedrne DNA pri standardnih rastlinskih vrstah in morskih kritosemenkah s slikovno citometrijo. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo: 26–28
- Fatur T., Perharič L., Hočevan-Grom A. 2005. Genotoksično in mutageno delovanje pesticidov, prisotnih v pitni vodi. V: Zbornik referatov. Vodni dnevi 2005, Portorož, 12.–13. okt. 2005. Slovensko društvo za zaščito voda: 1–2
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research 455: 81–95

- Fojtová M. in Kovařík A. 2000. Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. *Plant, Cell and Environment*, 23, 5: 531–537
- Francis D., Davies M. S., Braybrook C., James N. C., Herbert R. J. 1995. An effect of zinc on M-phase and G1 of the plant cell cycle in the synchronous TBY-2 tobacco cell suspension. *Journal of Experimental Botany*, 46, 12: 1887–1894
- Fras A., Maluszynska J. 2003. Chromosome aberrations and micronuclei assay in *Allium cepa* and *Vicia faba*. V: Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health, Katowice 2003. Maluszynska J. in Plewa M. (ur.). Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego: 77–81
- Fusconi A., Repetto O., Bona E., Massa N., Gallo C., Dumas-Gaudot E., Berta G. 2006. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 58, 1–3: 253–260
- Garcia – Rodríguez M. C., López – Santiago V., Altamirano – Lozano M. 2001. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research*, 496: 145–151
- Gichner T., Patkova Z., Szakova J., Demnerova K. 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research*, 559, 1–2: 49–57
- Grant W. F. 1999. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426: 107–112
- Health Council of the Netherlands. Committee for Compounds Toxic to Reproduction. 2004. Ethyl methanesulphonate; Evaluation of the effects on reproduction, recommendation for classification. The Hague: Health Council of the Netherlands.
- Heddle J. A., Cimino M. C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M. D., Tucker J. D., Vanparys P., MacGregor J. T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present and future. *Environmental and molecular mutagenesis* 18: 277–291

- Knasmüller S., Gottman E., Steinkellner H., Fomin A., Pickl C., Paschke A., Göd R., Kundi M. 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation research*, 420: 37–48
- Liu D. H., Jiang W. S. and Li M. X. 1992. Effects of Cd^{2+} on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Acta Sci. Circumstantiae*, 12: 439–446
- Liu D., Jiang W., Gao X. 2003/4. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. *Biologia Plantarum*, 47, 1: 79–83
- Liu D., Kottke I. 2004. Subcellular localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by electron energy loss spectroscopy and cytochemistry. *Journal of Biosciences*, 29: 329–335
- Ma T. H. 1999. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutation Research* 426: 103–106
- Ma T. H. 2006. "Hands on workshop on plant genotoxicity assay for environmental carcinogen screening, Dunaj, (osebni vir, jun. 2006)
- Ma T. H., Xu Z., Xu C., McConnell H., Rabago E. V., Arreola G. A., Zhang H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, 334, 2: 185–195
- Majer B. J., Tscherko D., Paschke A., Wennrich R., Kundi M., Kandeler E. and Knasmüller S. 2002. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: A comparative investigation. *Mutation Research*, 515: 111–124
- Majer B. J., Gottmann E., Knasmüller S. 2003. The micronucleus test with *Vicia faba* and *Allium cepa*. V: Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health, Katowice 2003. Maluszynska J. in Plewa M. (ur.). Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego: 83–93
- Majer B. J., Grummt T., Uhl M., Knasmüller S. 2005. Use of Plant Bioassays for the Detection of Genotoxins in the Aquatic Environment. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 33, 1: 45–55

- Maluszynska J., Juchimiuk J. 2005. Plant genotoxicity: A molecular cytogenetic approach in plant bioassays. Department of Plant Anatomy and Cytology, University of Silesia, Katowice, Poland. *Arh Hig Rada Toksikol* 56: 177–184
- Mitchell E. J. A. K., Burgess J. E., Stuetz R. M. 2002. Developments in ecotoxicity testing. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1: 169–198
- Mouchet F., Gauthier L., Mailhes C., Ferrier V., Devaux A. 2005. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environmental Toxicology*, 20, 1: 74–84
- NATO Advanced Study Institute on Plant Bioassay on the Genotoxicity of Contaminated Water, Air and Soil. Western Illinois University & Yerevan State University. 6.–16. 7. 2004 [predstavitev Power Point]
- Rank J., Nielsen M. H. 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research*, 390: 121–7
- Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C., Ecker S., Ma T. H., Horak O., Kundi M., Knasmüller S. 1998. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. *Environmental and molecular mutagenesis*, 31: 183–191
- Uhl M., Plewa M. J., Majer B. J., Knasmüller S. 2003. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. V: Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health, Katowice 2003. Maluszynska J. in Plewa M. (ur.). Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego: 11–25
- Ünyayar S., Çelik A., Çekiç F. O., Gözel A. 2006. Cadmium-induced genotoxicity citotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis*, 21, 1: 77–81
- Van Dyk J. C. 2003. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. M.Sc. Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa

- Vitosh M. L., Warncke D. D., Lucas R. E. 1994. Secondary and Micronutrients for Vegetables and Field Crops. Extension Bulletin E-486
- Voet D., Voet J. G. 1995. Biochemistry. Second Edition. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley and Sons, Inc.: 1361 str.
- Walsh C. T., Sandstead H. H., Prasad A. S., Newberne P. M., Fraker P.J. 1994. Zinc: Health Effects and Research Priorities for the 1990s. Environmental Health Perspectives, 102: 2–46
- White P. A., Claxton L. D. 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. Mutation Research / Reviews in Mutation Research, 567: 227–345
- Yesilda E. 2000. The effect of kinetin, gibberellic acid and indole acetic acid on EMS induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Turkish Journal of Biology, 24: 279–284.

PRILOGA A

Število čebul in korenin vsake obdelave vseh poskusov.

Poskus	Toksična snov	Konc. (mM)	Število čebul	Število korenin
1	H ₂ O	/	5	25
	Cd	0,00025	3	7
	Cd	0,0025	2	7
	Cd	0,025	3	12
	Cd	0,25	2	5
	Cd	2,5	3	8
	EMS	1	2	6
	EMS	3	3	9
	EMS	5	2	6
	EMS	8	2	8
	EMS	20	3	11
	EMS	40	3	11
2	H ₂ O	/	3	12
	EMS	1	3	13
	EMS	3	2	7
	EMS	5	3	10
	EMS	8	3	12
	EMS	20	3	10
	EMS	40	3	9
	EMS 48 ur	40	1	4
3	H ₂ O	/	3	12
	EMS	1	3	12
	EMS	3	3	12
	EMS	5	3	12
	EMS	8	3	12
	Zn	0,1	3	12
	Zn	0,5	3	7
	Zn	1	2	8
4	H ₂ O	/	3	11
	Zn	1	3	12
	Zn	3	2	10
	Zn	5	2	10
	Cd	0,00025	3	12
	Cd	0,0025	3	12
	Cd	0,025	3	12
	EMS	3	3	12