

EL USO DE PROTECTORES CONTRA AGENTES ALKILANTES Y SU IMPORTANCIA EN LA INDUCCION DE MUTACIONES EN PLANTAS

Sandra Gómez Arroyo*, Abraham Rubluo* e Ilse Briedis*

RESUMEN

Los agentes alkilantes han sido utilizados con éxito en la inducción de mutaciones en plantas, sin embargo su uso se ve frecuentemente limitado por los daños fisiológicos que ocasionan sus productos de degradación, tales como reducción de la tasa de germinación, la esterilidad, la disminución del tamaño de la planta o la inducción de alteraciones genéticas diferentes a las mutaciones. Las potencialidades de estos agentes mutagénicos pueden ampliarse si se conocen sus mecanismos de acción, lo que permitirá el control de los efectos indeseables que ellos inducen. Los efectos secundarios de los mutágenos se han podido reducir mediante la aplicación de diversas sustancias químicas. En el presente trabajo se hace un análisis de los mecanismos moleculares de protección propuestos y se discute la importancia que tienen estos hechos en el incremento de la efectividad mutagénica en plantas superiores.

INTRODUCCION

Durante mucho tiempo la inducción de mutaciones en plantas superiores útiles a la agricultura se efectuó mediante el uso de diferentes fuentes de radiación; sin embargo, en la actualidad se ha incrementado el uso de sustancias químicas que actúan como radiomiméticas e inducen mutaciones en ocasiones más eficientemente que los agentes físicos (Ehrenberg, 1971). Este hecho es importante, ya que la aplicación de los mutágenos químicos presenta algunas ventajas sobre las radiaciones como son la mayor disponibilidad de las sustancias en, prácticamente, cualquier laboratorio, puesto que no son necesarias instalaciones especializadas, el costo sensiblemente menor de cualquier mutágeno químico en comparación con las fuentes de

* Laboratorio de Radiobiología y Mutagénesis, Instituto de Biología, UNAM.

Abreviaturas:

AA , Agentes alkilantes;
EI , Etilenimina;
EMS , Etil metanosulfonato;
HZ , Hidrazina maleica,
iPMS, Isopropil metanosulfonato;
MMS , Metil metanosulfonato;
NG , Nitrosoguanidina;
OMMS, 2-oxopropil metanosulfonato

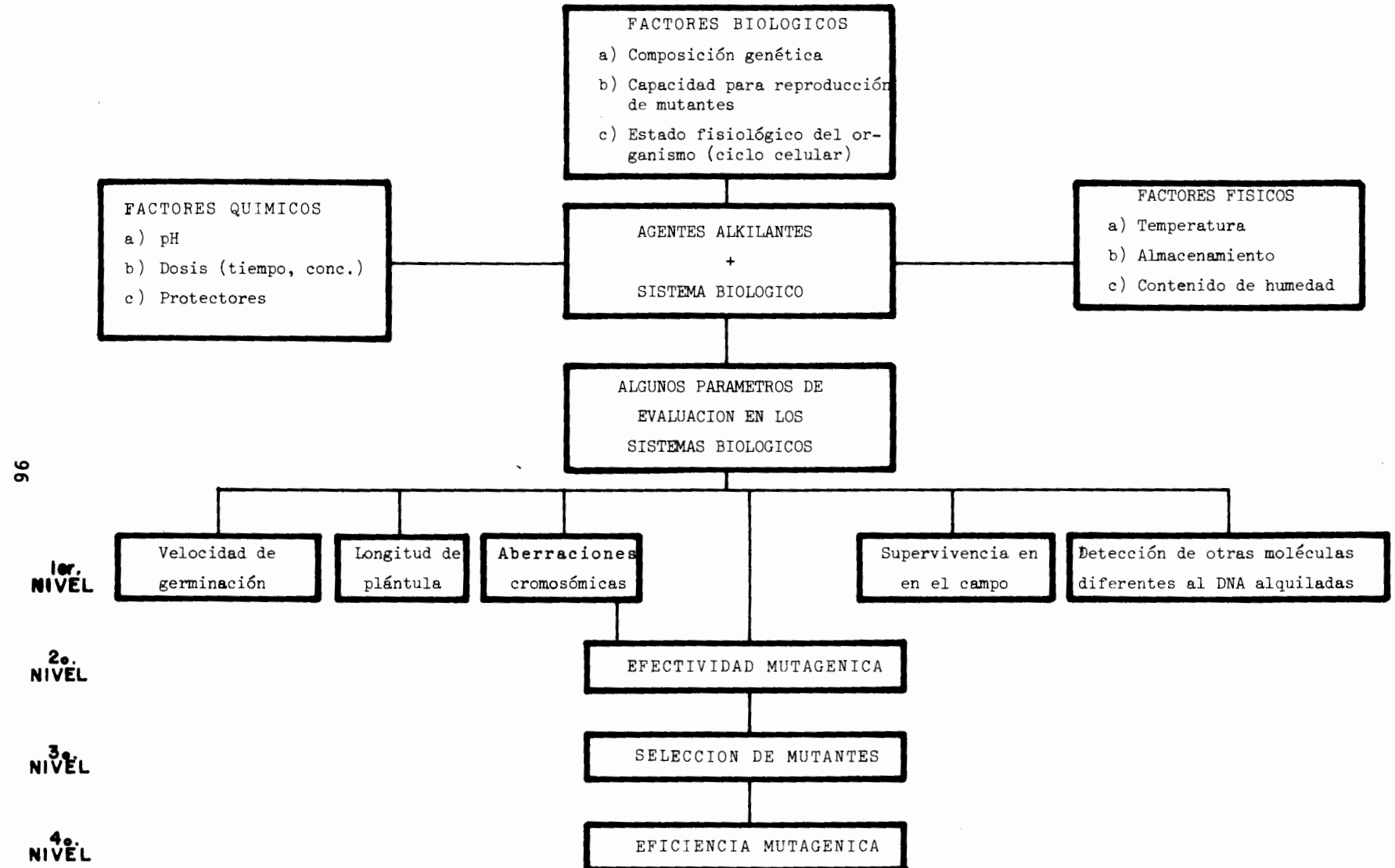
radiación, la amplia gama de sustancias que pueden probarse como mutágenos, etc.; pero quizá el aspecto más importante es que las sustancias son susceptibles de un mayor control en su manejo. En la Tabla 1 se dan algunos ejemplos de mutaciones inducidas con agentes químicos. Las anteriores consideraciones hacen necesario conocer mejor los mecanismos moleculares de acción de las sustancias sobre el material biológico, especialmente si se toma en cuenta la gran potencialidad que estos agentes mutagénicos tienen por una adecuada manipulación de los factores involucrados en el incremento de la efectividad y la eficiencia mutagénica, algunos de estos factores se muestran en el Esquema 1. Konzak (1965) definió "efectividad mutagénica" como la frecuencia de mutantes obtenidos en un determinado tratamiento, en tanto que "eficiencia" es la frecuencia de mutantes libres de caracteres indeseables.

Uno de los mayores limitantes en la obtención de mutantes es la toxicidad que generalmente acompaña a los agentes químicos, lo que ha provocado que se realicen esfuerzos para contrarestarla lavando el material tratado (Mikaelsen *et al.*, 1968), pero la aplicación de este método está limitado, ya que son necesarios largos períodos de lavado, reduciéndose el mutágeno residual en el tejido de la semilla a un nivel biológicamente insignificante, pudiendo además provocar la salida de los productos alquilados. Por otro lado la gran solubilidad de los AA en lípidos (Narayanan y Konzak, 1969) provoca que se unan fuertemente a las membranas celulares y que de esa forma permanezcan unidos más allá del tiempo de tratamiento e induzcan los efectos tóxicos indeseables.

Un método de control más factible consiste en el uso de sustancias químicas que reaccionan selectivamente con los remanentes del mutágeno; así, se han utilizado diferentes sustancias con éxito, haciéndose necesario conocer los mecanismos de interacción entre estos protectores y el mutágeno con el objeto de seleccionar la sustancia adecuada para un cierto tratamiento. La Tabla 2 muestra algunas de las sustancias utilizadas como protectores contra agentes mutagénicos químicos.

Tabla 1. Algunos ejemplos de plantas de importancia agronómica que han sido mejoradas a partir de tratamientos con mutágenos químicos.

E s p e c i e	Característica mejorada	Mutageno y Dosis	Referencia
<u>Hordeum vulgare</u> (cebada)	Pajilla corta, mayor rendimiento del grano	Dietil sulfato a 30°C 0.0038 M/ 3.5 hs.	Sigurbjórnsen y Micke, 1969.
<u>Triticum vulgare</u> (trigo)	Proteína total elevada	Etilenimina y Etil metano sulfonato	Dumanović <u>et al</u> , 1970.
<u>Arachis hypogaea</u> (cacahuete)	Aumento de tamaño y fertilidad	Dietil sulfato a 20°C, 1.5%/5, 15 y 25 min.	Ashri, 1972.
<u>Hordeum vulgare</u>	Aumento del contenido de lisina	Etil metanosulfonato 0.1 M/ 7 hs a 25°C.	Doll, 1972.
<u>Hordeum vulgare</u>	Rendimiento del grano	Etil metanosulfonato 1.8%/ 4.75 hs a 25°C.	Hánsel <u>et al</u> , 1972.
<u>Phaseolus vulgaris</u> (frijol)	Coloración de la cubierta	Etil metanosulfonato 0.04 M/ 6 hs a 20°C.	Moh, 1972.
<u>Hordeum vulgare</u>	Incremento de lisina y de treonina.	Etilenimina	Ingversen, Koie y Doll, 1973
<u>Oriza sativa</u> (arroz)	Contenido y distribución de proteínas	Etil metanosulfonato 0.6%/ 6 hs a 25°C.	Madhusudana y Siddiq. 1976.
<u>Hordeum vulgare</u>	Acortamiento de tallo y tiempo de maduración del grano	Dietil sulfato (solución saturada 30 min) a 25°C.	Yamaguchi, 1976.



Esquema 1. Algunos de los factores que pueden ser controlados para elevar la efectividad y eficiencia mutagénica utilizando agentes alkilantes

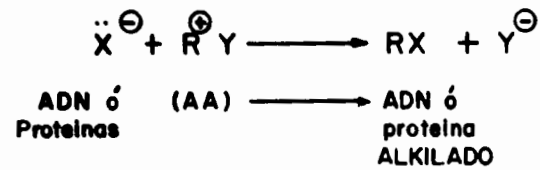
Tabla 2. Substancias utilizadas como protectores contra la acción tóxica de mutágenos químicos en plantas superiores.

Substancia	Mutagénico	Especie analizada	Parámetro evaluado	Efecto	Referencia
Cisteína	NG	Haba, Cebada	% de germinación, longitud de la plántula y rompimientos cromosómicos	Protegió	Kaul, 1969
Cisteína	EMS	Cebada	Longitud de la plántula	Ligera protección	Narayanan y Konzak, 1969
Tiosulfato	EMS iPMS	Cebada	Longitud de la plántula, fertilidad en M_1 .	Protegió	Narayanan y Konzak, 1969.
Tioacetamida	EMS	Cebada	Longitud de la plántula	Ligera protección	Narayanan y Konzak, 1969.
Cisteína	EI	Cebada	% de germinación, tamaño de la plántula y aberraciones cromosómicas.	Protegió	Kaul y Choundary, 1972.
Tiourea	EI EMS	Cebada	% de germinación y tamaño de plántula	No protegió	Kaul y Choundary, 1972.
Cisteína	EI	Chícharo	% de germinación, tamaño de la plántula y aberraciones cromosómicas.	Protegió	Bhojwani y Kaul, 1976.
Urea	EI	Chícharo	% de germinación, tamaño de la plántula y aberraciones cromosómicas	No protegió	Bhojwani y Kaul, 1976.
Cisteína	HZ	Sorgo	% de germinación plántula y supervivencia	Protegió	Reedy, 1976.
Acido giberélico	EMS MMS	Chícharo	Aberraciones cromosómicas	Protegió	Narsinghani y Kumar, 1976.

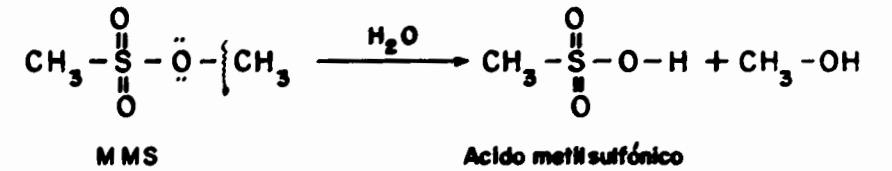
DAÑO PRODUCIDO POR LOS AGENTES ALKILANTES

Entre las sustancias, los agentes alkilantes son el grupo más utilizado como inductor de mutaciones (Ehrenberg, 1971) además de ser el más eficiente (Nilan, 1973), ya que posee radicales capaces de ser transferidos a otras moléculas especialmente en los sitios de alta densidad electrónica y presenta centros nucleofílicos, de tal manera que cuando un átomo de hidrógeno es reemplazado por un radical alkilo, se produce una molécula alkilada inestable. El mecanismo de alquilación completo puede resumirse de la manera como aparece en la Figura 1.

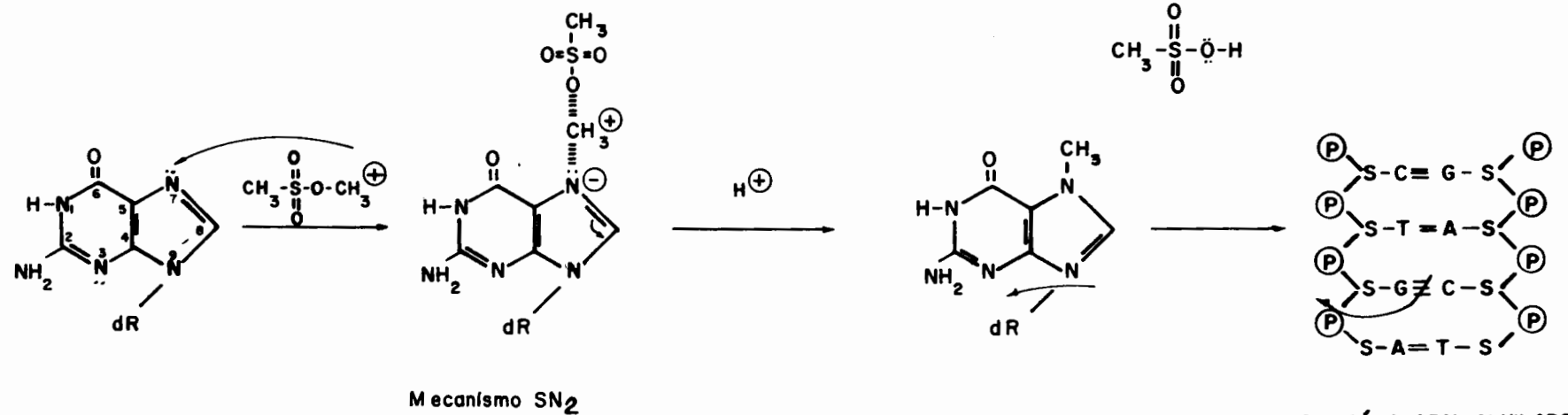
De la acción de los AA mostrada en la Figura 1, se observa que fundamentalmente el daño fisiológico proviene de la alta toxicidad de los productos de degradación obtenidos durante la reacción de hidrólisis, así como del propio mecanismo de alquilación, ya que la reacción no es específica sobre el ADN, sino que también se presenta sobre cualquier sustancia rica en centros nucleofílicos, tales como proteínas estructurales importantes o sistemas enzimáticos que al ser degradados, bloquean funciones vitales esenciales. De hecho, se ha postulado (Osterman-Golkar et al., 1970) que la principal fuente de daño fisiológico en plantas tratadas con AA se debe a la inactivación de proteínas por la alquilación; así por ejemplo, se ha descrito que el iPMS presenta los niveles de ataque a proteínas más bajos y alkila 12 de proteínas por cada molécula de ADN, en tanto que otros compuestos como el OMMS constituyen el extremo más tóxico con un valor de 1 molécula de ADN alkilada por cada 400 moléculas de proteína; el EMS, que es posiblemente el más utilizado de los AA, presenta un valor de 150 de ADN por 100 de proteína en tanto que el MMS tiene valores de 40 a 100. Esto redundo en la disminución de la efectividad mutagénica cuando estas tasas de valores son bajas; sin embargo, al establecer comparaciones entre el MMS y EMS (Arnason y Minocha, 1965; Minocha y Arnason, 1962) se nota que el primero es más eficiente a bajas dosis, en tanto que el segundo incrementa su valor conforme aumentan las dosis (Gómez-Arroyo et al., 1976), siendo así más eficiente, lo que es debido quizás a las condiciones estéricas de la molécula del MMS que al ser más pequeña puede penetrar



a) REACCION GENERAL DE ALKILACION



b) REACCION DE HIDROLISIS DEL MMS



c) REACCION DE ALKILACION DEL MMS SOBRE N_7 DE LA GUANINA DEL ADN

Sección de ADN ALKILADO

P = Grupos fosfato A = Adenina
S = Desoxiribosa T = Timina
C = Citosina G = Guanina

FIG. 1.- Mecanismos de acción del MMS

más fácilmente que la del EMS, que, sin embargo, a altas dosis podrían llegar a alkilar más ADN (produciendo las mutaciones) y menos proteínas (reduciendo la toxicidad).

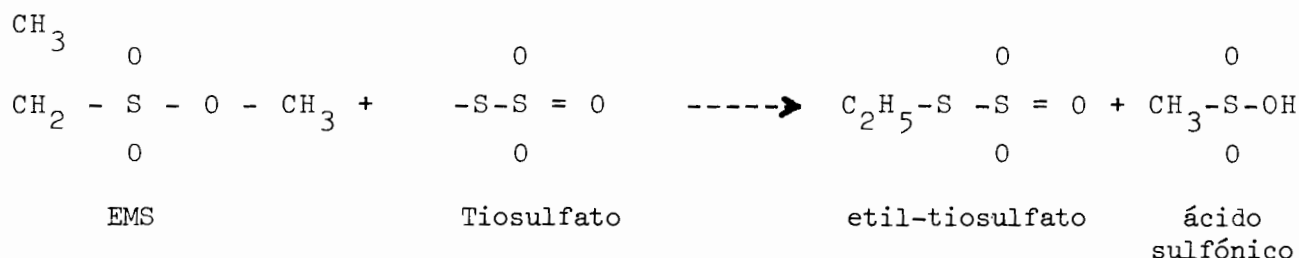
La respuesta primaria a la acción tóxica de los AA en las plantas tratadas se manifiesta en daños fisiológicos o citogenéticos, de manera que el control de estas alteraciones que se presentan en la generación M_1 , han sido los parámetros a evaluar en el estudio de los mecanismos de protección, ya que generalmente las plantas tratadas no presentan ninguna alteración fisiológica o citogenética al pasar a la generación M_2 .

MECANISMOS DE ACCION PROPUESTOS PARA PROTECTORES CONTRA LA TOXICIDAD DE AA

La gran mayoría de las sustancias utilizadas como protectores contra los AA, presentan ciertas similitudes en su estructura química, indicando que los mecanismos de acción tienen un substrato similar, el cual variará sólo con las condiciones experimentales y el agente mutagénico utilizado.

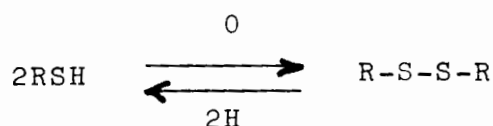
De acuerdo con Narayanan y Konzak (1969) dentro de las características comunes a los protectores, está el hecho de que presentan una nula o por lo menos baja toxicidad a las concentraciones a las que son empleados; además, deben presentar una alta reactividad con el mutágeno, alta solubilidad en H_2O para su fácil transporte a través de las membranas celulares, y una baja toxicidad de los productos de reacción entre el protector y el mutágeno.

Los compuestos sulfidrílicos o tioles han sido muy utilizados como protectores debido a la marcada nucleofilidad del azufre contenido en sus moléculas, este hecho, además de la presencia en algunos de ellos de grupos con cargas formales negativas, los convierten en importantes centros nucleofílicos susceptibles de reaccionar con los AA, entrando en competencia con las proteínas y las enzimas celulares que de esta forma quedan protegidas. Si se considera al tiosulfato, que es una de las sustancias descritas con mayor valor de protección (Narayanan y Konzak, 1969), es posible notar en su estructura química un fuerte centro nucleofílico cuya reacción con un alkilante, por ejemplo el EMS, sería:

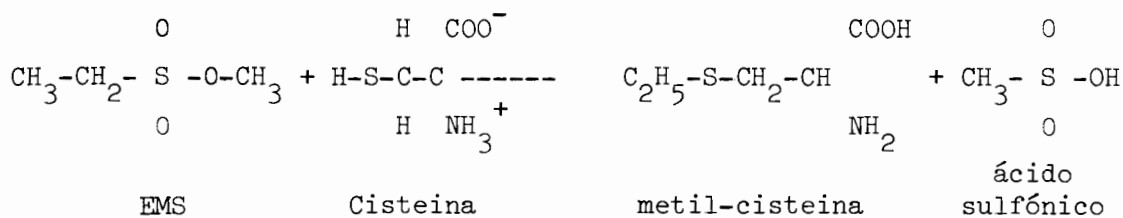


Por otro lado, la sustancia protectora más utilizada es probablemente la cisteína (Tabla 2), la cual es un aminoácido azufrado; sin embargo, los resultados obtenidos con este protector son inconsistentes ya que algunos autores (Narayanan y Konzak, 1969), describen una baja protección, en tanto que otros encuentran fuerte protección (Kaul, 1969; Kaul y Choudhary, 1972; Bhojwani y Kaul, 1976). La explicación probable de estas diferencias en los resultados puede estar relacionada con los mecanismos de reacción propios de cada mutágeno o con las condiciones experimentales dadas; sin embargo, es conveniente también considerar la estructura química de este aminoácido, el cual presenta como sitios de acción nucleofílica tanto su grupo sulfidrido como el grupo carboxilo ionizado.

La L-cisteína al oxidarse pasa a cistina con un puente disulfuro, esta reacción es reversible, aunque se sabe (Romantsev, 1968) que su tasa de reversibilidad es baja. La reacción general de oxidación en este caso sería:



por esta razón, algunos autores (Narayanan y Konzak, 1969) recomiendan el uso de estabilizadores de la oxidación, tales como el ditioneitol durante los tratamientos de protección, pero otros investigadores encuentran aún más protección con la cisteína sin usar el estabilizador (Kaul, 1969; Kaul y Choudhary, 1972; Bhojwani y Kaul, 1976). Al reaccionar la cisteína con un AA tal como el EMS se tendría:



El ácido sulfónico (el cual es altamente tóxico) en esta reacción como en la del tiosulfato también se presenta, por lo que esta vía de daño parece difícil de controlar; se ha intentado (Wickham *et al.*, 1969) utilizar amortiguadores para contrarrestar los efectos tóxicos de los productos de degradación, pero se ha encontrado¹ que los amortiguadores destruyen la molécula de los AA, desde prácticamente el primer momento, por lo que su acción mutagénica se vería de esta forma nulificada (Figura 2).

La conclusión más importante de lo anteriormente discutido, es la alta especificidad de los estudios requeridos para establecer la efectividad y eficiencia de un mutágeno químico en la inducción de mutaciones útiles en agricultura, es decir, para cada tratamiento utilizado deben considerarse todos los factores físicos, químicos y biológicos, así como las interacciones que puedan presentarse entre estos para que el investigador, manipulándolas adecuadamente, pueda obtener el óptimo en sus objetivos.

BIBLIOGRAFIA

1. Arnason, T. L. and J. L. Minocha. 1965. Mutation frequencies in barley after methyl-methanesulfonate treatments. *Canad. Jour. Genetics and Cyt.* 7:262-276.
2. Ashri, A. 1972. Mutations and physiological reaction to several chemical mutagens in peanuts, *Arachis hypogaea* L. In: Induced mutations and plants improvement. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp:253-264.
3. Bhojwani, K. and B. K. Kaul. 1976. Mutagenic effects of ethyleneimine on pea, as affected by cysteine and urea. *Ind. Jour. of Agr. Sci.* 46:524-527.
4. Doll, H. 1972. Variation in protein quantity and quality induced in barley by EMS treatment. In: Induced mutations and plant Improvement. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp:331-342.

¹ Rubluo I., A. Datos no publicados.

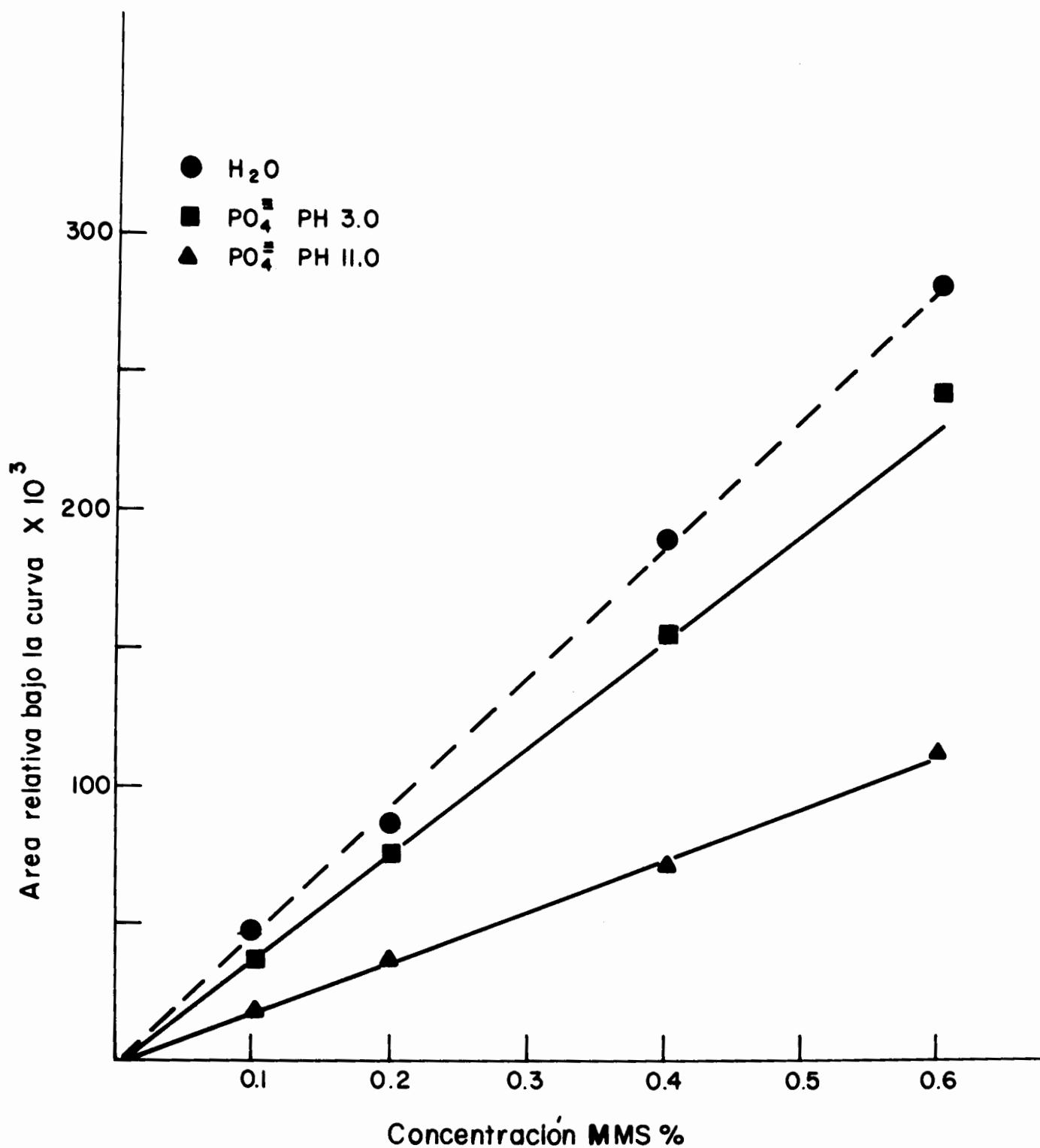


FIG. 2.- Efecto de los amortiguadores de fosfatos sobre la degradación del MMS, inmediatamente después de efectuada la solución.

5. Dumanovic, J., L. Ehrenberg and M. Denic. 1970. Induced variation of protein content and composition in hexaploid wheat. In: Improving plant protein by nuclear techniques. International Atomic Energy Agency, Vienna, p. 107.
6. Ehrenberg, L. 1971. Higher plants. In: A. Hollaender (Ed.), Chemical mutagens, principles and methods for their detection, Vol. 2, Plenum, New York, pp: 365-386.
7. Gómez-Arroyo, S., A. Rubluo I. y R. Villalobos-Pietrini. 1976. Significación en la mutagénesis de las aberraciones cromosómicas inducidas por el metil metanosulfonato. In: Memorias del VI Congreso Nacional de Fitogenética. Monterrey, México. pp: 476-490.
8. Hänsel, H., Simon, W. and K. Ehrendorfer. 1972. Mutation breeding for yield and kernel performance in spring barley. In: Induced mutation and plant improvement. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp: 221-235.
9. Ingversen, J., B. Koie and H. Doll. 1973. Induced seed protein mutant of barley. *Experientia* 29:1151.
10. Kaul, B. L. 1969. Modification of the radiomimetic effects of nitrosoguanidine by cysteine in plants. *Experientia* 25: 57-61.
11. _____ and D. K. Choudhary. 1972. Cystein protection against ethylenimine damage in barley seeds. *Rad. Bot.* 12:57-61.
12. Madhusana, R. G. and E. A. Siddiq. 1976. Studies on induced variability for amylose content with reference to yield components and protein characteristics in rice. *Env. and Exp. Bot.* 16:177-188.
13. Mikaelson, K., G. Ahnstrom and W. C. Li. 1968. Genetic effects of alkylating agents in barley. Influence of poststorage, metabolic state and pH of mutagen solution. *Hereditas* 59: 353-374.
14. _____, H. Brunner and W. C. Li. 1971. Influence of post wash time on mutagenic effects of ethyl methanesulfonate (EMS) in barley seeds. *Hereditas* 69:15-18.
15. Minocha, J. L. and T. L. Arnason . 1962. Mutagenic effectiveness of ethyl methane sulfonate and methyl methane sulfonate in barley. *Nature* 196:499.
16. Moh, C. C. 1972. Induced seed-coat colour mutations in beans and their significance for bean improvement. In: Induced mutations and plant improvement. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp:67-72.
17. Narayanan, K. R. and C. F. Konzak. 1969. Influence of chemical post-treatments on the mutagenic efficiency of alkylating agents. In: Induced mutations in plants. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp:281-304.

18. Narsinghani, V. G. and S. Kumar. 1976. Gibberellic acid protection against EMS and MMS induced damage to chromosomes in Pisum sativum L. Cytologia 41:291-298.
19. Nilan, R. A. 1973. Increasing the effectiveness, efficiency and specificity of mutation induction in flowering plants. In: Genes, Enzymes and Populations. A. M. Srb (Ed.). Plenum, New York, pp:205-219.
20. Osterman-Golkar, S., L. Ehrenberg and C. A. Wachtmeister. 1970. Reaction kinetics and biological action in barley of mono functional methane-sulphonic esters. Rad. Bot. 10:303-327.
21. Reddy, C. S. and J. D. Smithe. 1976. Viable mutations in grain sorghum induced by gamma-rays, chemical mutagens and their combinations with cysteine. Genetics 83:561.
22. Romantsev, E. F. 1968. Radiación y protección química (en Russo). Atomizdat. Moscú. pp:161-167.
23. Sigurbjornsson, B. and A. Micke. 1969. Progress in mutation breeding. In: Induced mutations in plants. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp:673-698.
24. Wickman, M. I., R. K. Narayanan and C. F. Konzak. 1969. Influence of pH and concentration of phosphate buffer on the degradation of alkyl alkanesulphonates. In: Induced Mutations in Plants. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp:153-167.
25. Yamaguchi, H. 1976. Mutations induced in presoaked barley seeds by diethyl sulfate and 5-bromodeoxyuridine. Env. and Exp. Bot. 16:145-149.