

ВОЗДЕЙСТВИЕ НИТРАТА СВИНЦА НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

М. В. Белоусов, О. С. Машкина, В. Н. Попов

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 26.10.10 г.

Аннотация. Показано существенное влияние нитрата свинца на цитогенетическую изменчивость проростков сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). Рассматриваются возможные механизмы его действия. Высказывается предположение о том, что действие свинца связано с блокировкой полимеризации тубулина микротрубочек веретена деления, что приводит к задержке клеточного цикла на стадиях метафазы и мета-анафазы митоза, а также с его ингибирующим действием на ферменты репарации ДНК.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, цитогенетическая изменчивость, свинец.

Abstract. Nitrate lead essential influence on cytogenetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings has been studied. Possible mechanisms of its action are under consideration. Comes out with the assumption that action of lead is connected with tubulin blocking polymerization of microtubules of division spindle are stated which leads to the delay of a cellular cycle at stages of a metaphase and meta-anaphase of mitosis, and also with its inhibiting effect on DNA repair enzymes.

Keywords: Scots pine, cytogenetic variability, lead.

ВВЕДЕНИЕ

Современное состояние окружающей среды в первую очередь определяется деятельностью человеческого общества.

Быстрое развитие промышленности во второй половине XX века повлекло за собой ощутимое загрязнение окружающей среды и резкое ухудшение экологической ситуации в различных регионах планеты. Среди многочисленных загрязнителей наиболее токсичными, после пестицидов, считаются тяжелые металлы (ТМ) [1]. Именно поэтому исследования многих ученых в последние десятилетия направлены на изучение влияния ТМ на растения и животных. Благодаря этому было установлено, что, хотя многие ТМ не являются необходимыми для жизнедеятельности растений, они могут ими активно поглощаться и долго сохранять токсические свойства, оказывая тем самым длительное отрицательное действие и последствие на организм.

Изучению влияния ТМ на рост и развитие растений посвящено довольно большое число работ [2], однако, в большинстве своем такого рода исследования проводились на травянистых растениях, имеющих сельскохозяйственное значение. Древесные растения изучены в этом плане гораздо

хуже. В частности, практически отсутствуют работы экспериментального характера, направленные на изучение действия конкретных металлов на важнейшие цитогенетические показатели хвойных древесных растений. Известны работы по изучению металлоустойчивости березы к меди, цинку и кадмию [3], а также свинцу [4]. Между тем, именно хвойные, в частности сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), являются перспективными для контроля загрязнения окружающей среды. Они обладают высокой радиочувствительностью (близкой к человеку). Сосна имеет длительный генеративный цикл (с момента закладки генеративных органов до созревания семян проходит более двух лет), что делает ее очень чувствительной в условиях хронического действия антропогенных поллютантов, приводящих к накоплению достаточного для индикации внешнего воздействия количества повреждения ДНК [5].

К ТМ условно относят химические элементы с атомной массой свыше 50 атомных единиц, обладающими свойствами металлов и металлоидов. Считается, что среди химических элементов ТМ являются наиболее токсичными. Основными источниками ТМ являются выбросы автотранспорта и промышленных предприятий, где одно из лидирующих мест занимает свинец (Pb). Накапливаясь в почве, превышая предельно допустимые концентрации (ПДК по свинцу в почве 6 мг/г), он

оказывает отрицательное действие на рост и развитие растений [1]. Изучение действия конкретных металлов (свинца) на цитогенетические показатели (проявляющие высокую чувствительность к воздействию стрессоров различной природы), позволит выявить специфику их действия и возможные цитогенетические механизмы адаптации растений.

Целью настоящих исследований явилось изучение цитогенетической изменчивости у сосны обыкновенной под действием различных концентраций нитрата свинца (в опытных вариантах) в сравнении с контролем.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследования служили семена деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) из Воронежского государственного биосферного заповедника (ВБГЗ), рассматриваемого по данным цитогенетического анализа как эталон экологической безопасной территории [6]. В опытных вариантах семена предварительно замачивали в растворах нитрата свинца $Pb(NO_3)_2$ разной концентрации (от 0,5 до 2000 мкМ, что соответствует примерно от 5 до 22 000 ПДК) в течение 18 часов. Затем проращивали на этих же растворах в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 25 °С (5—7 дней). Контролем служили семена, замоченные и пророщенные в отстоянной водопроводной воде при той же экспозиции.

Проростки с корешками, достигшими 0,5—1 см, фиксировали спиртово-уксусной смесью (3 : 1). В качестве красителя использовали ацетогематоксилин. Перед окраской для лучшей мацерации тканей корешки проростков семян сосны подвергали гидролизу в 18%-ой соляной кислоте в течение 5 мин., а затем промывали их в 6—7 сменах 45%-ой уксусной кислоты. Постоянно-давленные препараты (1 корешок — 1 препарат) готовили путем заключения материала (отдифференцированных после окрашивания кончиков корешков) в каплю смеси Гойера [6]. Просмотр микропрепаратов осуществляли с помощью микроскопа Микмед-6 (ЛОМО) при увеличении $40 \times 1.5 \times 10$. Просматривали не менее 1000 клеток с каждого препарата. Нами использовались следующие наиболее чувствительные критерии цитогенетического мониторинга:

1) определяли митотическую активность меристематической ткани по митотическому индексу (МИ) (отношение числа делящихся клеток к общему числу просмотренных клеток в %) в ее

пик, приходящийся на 9 часов утра по зимнему времени, как показатель интенсивности ростовых процессов;

2) число клеток на каждой стадии (в %) для определения их продолжительности;

3) общее число патологий митоза (ПМ) (отношение числа клеток с нарушениями митоза к общему числу делящихся клеток в %) и наиболее характерные типы митотических нарушений по каждой стадии;

4) произвели подсчет микроядер (отношение числа клеток с микроядрами к общему числу интерфазных клеток в %), поскольку этот показатель является хорошим методом, показывающим эффективность работы систем репарации;

5) подсчитывали число клеток с n количеством ядрышек в интерфазных клетках с определением их доли (в %) с тем или иным количеством.

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных осуществлялась с использованием программ Stadia и Statistica.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Всхожесть семян (определенная на 15 день проращивания) составила в контрольном варианте $75,5 \pm 4,3$ %, а в опытных вариантах варьировала от 37 до 67 % (с понижением % всхожести по мере увеличения концентрации нитрата свинца). В опытных вариантах рост корешков проростков был крайне замедлен, и они с трудом достигали нужной для фиксации длины.

Результаты цитогенетического исследования семенного потомства сосны обыкновенной в зависимости от концентрации нитрата свинца представлены в таблице.

С возрастанием концентрации нитрата свинца отмечено достоверное (начиная с 50 мкМ и выше) снижение МИ (от 8 % в контроле до 6,0—7,9 % в опытных вариантах). В опытных вариантах отчетливо видно существенное преобладание (по сравнению с контролем) метафазы с заметным снижением доли клеток на стадии профазы, а также промежуточной фазы деления (мета-анафазы). Ингибирование митотической активности может быть связано с задержкой митоза на стадии метафазы и метаанафазы (в таблице приведены данные их отдельного и совместного подсчета) в опытных вариантах (от 40 % до 46,5 % против 29,9 % в контроле). Причиной этого может быть блокировка полимеризации тубулина микротрубочек веретена деления под действием свинца, что наблюдалось рядом авторов на других объектах [7, 8].

Возрастание доли клеток, находящихся на стадии метафазы и мета-анафазы, также дает нам основание рассматривать изменение времени прохождения клетками стадий митоза как механизм адаптации к стрессовым факторам и поддержания гомеостаза клеточной популяции у проростков семян сосны обыкновенной в опытных вариантах. Подобные аспекты были отмечены у семенного потомства березы повислой и дуба черешчатого на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС [9].

По частоте встречаемости нарушений митоза можно судить об интенсивности мутационного процесса в клеточных популяциях организма (поскольку патологический митоз может стать источником геномных мутаций и хромосомных aberrаций), по спектру нарушений — о степени повреждения генетического материала, т. е. совместимости с жизнью возникающих повреждений [10]. Данные по изучению частоты и спектра ПМ в потомстве деревьев сосны из контрольного и опытного вариантов представлены в таблице и на рис. 1.

Таблица

Влияние различных концентраций нитрата свинца на цитогенетические показатели сосны обыкновенной

Цитогенетические показатели, %		контроль	0,5 мкМ	5 мкМ	50 мкМ	500 мкМ	2000 мкМ
МИ		8,0 ± 0,2	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,1 ± 0,1 ²	6,5 ± 0,1 ²	6,0 ± 0,1 ²
Доля профаз		22,7 ± 1,1	20,6 ± 1,0 ³	13,9 ± 0,3 ³	13,3 ± 0,3 ³	12,5 ± 0,3 ³	11,5 ± 0,3 ³
Доля метафаз		28,8 ± 1,0	29,0 ± 1,0	33,6 ± 0,5 ²	34,2 ± 0,5 ²	34,6 ± 0,5 ²	32,4 ± 0,7 ²
Доля мета-анафаз		1,0 ± 0,2	1,4 ± 0,2 ²	6,4 ± 0,3 ³	7,9 ± 0,2 ³	10,0 ± 0,3 ³	14,1 ± 0,4 ³
Доля метафаз + мета-анафаз		29,9 ± 1,0	30,5 ± 1,0 ³	40,0 ± 0,5 ³	42,1 ± 0,6 ³	44,5 ± 0,4 ³	45,6 ± 0,7 ³
Доля анафаз		29,2 ± 0,5	28,4 ± 0,4 ²	28,9 ± 0,4	27,9 ± 0,5	27,4 ± 0,5 ²	27,2 ± 0,5 ²
Доля телофаз		18,3 ± 0,6	20,5 ± 0,3 ³	17,2 ± 0,6	16,7 ± 0,7 ²	15,6 ± 0,5 ²	15,8 ± 0,4 ³
ПМ		2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,2	5,1 ± 0,4 ³	6,1 ± 0,3 ³	9,4 ± 0,3 ³	19,4 ± 0,4 ³
Типы патологий митоза	Отставания хромосом в анафазе	17,5 ± 6,2	19,2 ± 6,2 ²	16,8 ± 3,2 ³	10,6 ± 2,3 ³	13,1 ± 0,8 ³	7,6 ± 0,7 ³
	Отставания хромосом в метакинезе	54,2 ± 6,2	49,2 ± 6,3 ²	41 ± 3,2 ³	41,1 ± 2,5 ³	42,8 ± 1,6 ³	36,5 ± 1,2 ³
	Мосты	28,3 ± 4,5	25,0 ± 4,4 ²	28,8 ± 2,5	31,5 ± 1,9 ³	23,0 ± 1,7 ³	14,3 ± 0,8 ³
	Сложные нарушения	0	1,7 ± 1,7	2,9 ± 1,6 ¹	3,3 ± 1,8 ¹	5,3 ± 1,5 ²	6,9 ± 1,2 ³
	Фрагментация хромосом	0	3,3 ± 2,3	8,3 ± 2,7 ³	11,4 ± 2,7 ³	13,4 ± 2,7 ³	32,4 ± 1,9 ³
	Обособление группы хромосом	0	1,7 ± 1,7	2,3 ± 1,6	2,1 ± 1,6	2,6 ± 1,2 ¹	2,1 ± 0,7
Микроядра		0,01 ± 0,007	0,01 ± 0,007	0,06 ± 0,013 ¹	0,13 ± 0,014 ³	0,21 ± 0,014 ³	0,88 ± 0,039 ³

Различия с контролем (для сложных нарушений, фрагментации и обособления хромосом с опытным вариантом с концентрацией 0,5 мкМ) достоверны при: ¹ — $P < 0,05$; ² — $P < 0,01$; ³ — $P < 0,001$.

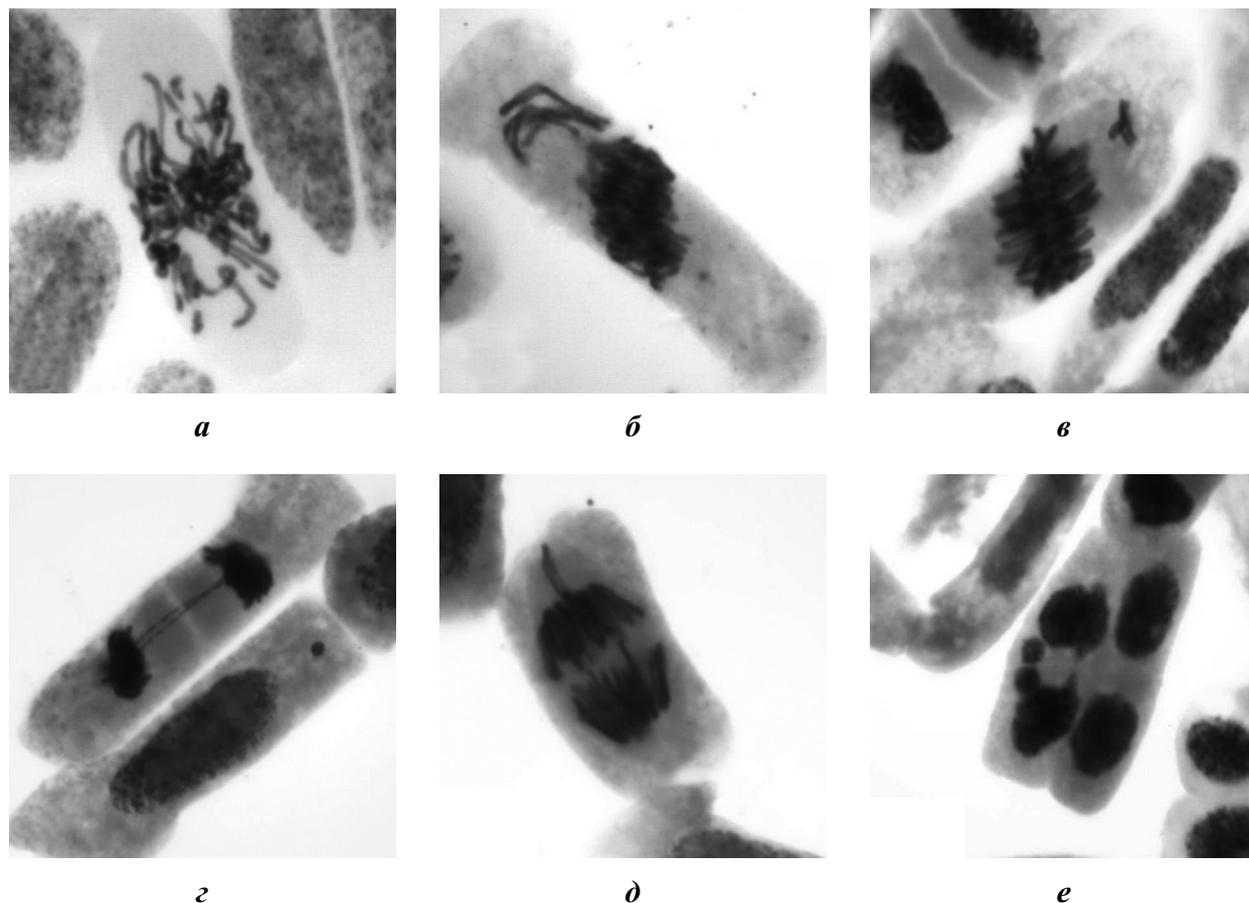


Рис. 1. Типы патологий митоза, встречающиеся в корневой меристеме проростков сосны, обработанных нитратом свинца: *a* — фрагментация хромосом в метафазе; *б*, *в* — обособление группы хромосом в мета-анафазе (*б*) и метафазе (*в*); *г* — двойной мост в анафазе; *д*, *е* — сложные нарушения: мост + отставание хромосом в метакинезе (*д*), деление микроядра + мост + частичная агглютинация (*е*)

Достоверное увеличение частоты ПМ наблюдается начиная с концентрации нитрата свинца 5 мкМ (5,1 % по сравнению с 2,8 % в контроле и 2,9 % при концентрации 0,5 мкМ), что превышает пределы нормального значения уровня спонтанного мутирования в средней полосе России — до 5 % [6]. Следует отметить, что для сосны обыкновенной порог чувствительности к свинцу выше, чем у березы повислой [4].

Полученные данные свидетельствуют о большей чувствительности показателя ПМ к действию свинца по сравнению с МИ (ингибирование наблюдалось при концентрации 50 мкМ, что в 10 раз выше порога чувствительности показателя ПМ).

В контроле спектр ПМ был представлен отставаниями хромосом в анафазе и метакинезе и мостами в анафазе. Такие нарушения могли быть следствием спонтанного мутационного процесса в результате флуктуации погодных факторов или действия вторичных метаболитов, образующихся

в ходе нормальных метаболических процессов в организме, которые в большинстве случаев исправляются репарационными системами клетки.

В опытных вариантах, кроме вышеотмеченных ПМ, выявлены: фрагментация и обособление группы хромосом в метафазе, а также сложные нарушения (мост + отставание хромосом в анафазе, мост + частичная агглютинация хромосом в ана-телофазе, разорванные мосты, разорванные мосты при делении ядра и микроядра) (рис. 1). Это свидетельствует о повышении уровня мутационного процесса (хромосомных перестроек) под воздействием свинца. Кроме того отмечены нарушения несовместимые с жизнью, отсутствующие в контроле (агглютинация хромосом; значительная доля микроядер, превышающая контроль до 88 раз). При увеличении концентрации нитрата свинца растет и количество микроядер (достоверное увеличение происходит, как и у ПМ, при концентрации 5 мкМ), что свидетельствует о повы-

шении доли нерепарированных повреждений хромосомного материала.

Ядрышковая активность у сосны способна изменяться в широких пределах, что проявляется в присутствии в клетках от 1 до 12 ядрышек. Причем количество ядрышек возрастает в экстремальных условиях [11]. В контрольном варианте преобладают клетки с 3—5 ядрышками (с максимумом — клетки с 4 ядрышками), что является нормой для сосны обыкновенной [6] и свидетельствует о преобладающей активности ядрышковых организаторов двух—трех пар хромосом. В опытных вариантах преобладают клетки с 5—8 ядрышками в клетке (с максимумом клеток с 6 ядрышками). Причем существенно возрастает число клеток с максимальным количеством ядрышек (10—11 ядрышками в ядре) по сравнению с контролем (в среднем в 13 раз), что может быть еще одним показателем усиления метаболической активности под воздействием стресса (нитрата свинца).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно говорить о высокой степени генотоксичности нитрата свинца (в концентрации от 5 до 2000 мкМ) на семенное потомство сосны обыкновенной. Это проявляется в существенном изменении цитогенетических показателей по сравнению с контролем. С увеличением концентрации свинца (начиная с 50 мкМ и выше) отмечено ингибирование митотической активности, задержка митоза на стадиях метафазы и перехода метафаза-анафаза (что, по-видимому, может обеспечить дополнительное время для репарации повреждений хромосомного материала), повышение частоты и спектра ПМ и доли микроядер. Выявлено появление специфических ПМ (фрагментации и обособления группы хромосом на стадии метафазы, наличие в общем спектре сложных нарушений, агрегаций хромосом), отсутствующих в контроле. Высказывается предположение о том, что действие свинца связано с блокировкой полимеризации тубулина микротрубочек веретена деления, что приводит к задержке клеточного цикла на стадиях метафазы и мета-анафазы митоза, а также с его ингибирующим действием на ферменты репарации ДНК.

Исследования поддержаны федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические

кадры для инновационной России» (ГК № П395, П270, 14.740.11.0114, 14.740.11.0169).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джувеликян Х. А. Экология и человек / Х. А. Джувеликян. — Воронеж: ВГУ, 1999. — 264 с.
2. Серегин И. В. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения / И. В. Серегин, В. Б. Иванов // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 606—630.
3. Кузнецова Т. Ю. Влияние кадмия на морфо-физиологические показатели березы *in vitro* / Т. Ю. Кузнецова, А. Ф. Титов, Л. В. Ветчинникова // Лесной журнал. 2008. № 3. С. 40—45.
4. Найденова Л. С. Проведение цитогенетического мониторинга в г. Воронеже, используя древесные породы деревьев, на примере березы повислой (*Betula pendula Roth*) / Л. С. Найденова, С. А. Епринцев, В. Н. Попов // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2008. № 1. С. 115—122.
5. Сравнительный анализ методами биоиндикации антропогенного загрязнения района расположения предприятия по переработке и хранению радиоактивных отходов из 30-км зоны ЧАЭС / С. А. Гераськин [и др.] // Экология. 2000. № 4. С. 300—303.
6. Перспективы использования цитогенетического анализа в лесоводстве на примере оценки состояния островных боров Воронежской области / А. К. Буторина [и др.] // Успехи современной биологии. 2008. Т. 128, № 4. С. 400—408.
7. The molecular mechanism of interaction of Et_3Pb^+ with tubulin / H. Faulstich [et al.] // FEBS. 1984. V.174, №1. P. 128—132.
8. Закономерности индукции цитогенетических эффектов у растений при действии тяжелых металлов / Т. И. Евсеева [и др.] // Вестник института биологии. 2005. Т. 87, №1. С. 4—13.
9. Artyukhov V. C. Cytogenetic indices of English oak (*Quercus robur L.*) seminal progeny subject to radioactive radiation in the Chernobyl nuclear disaster and growing on territories with different levels of anthropogenic contamination / V. C. Artyukhov, V. N. Kalaev // 20 Years after Chernobyl Accident: past, present and future. New York: Nova Science Publishers, 2006. С. 247—264.
10. Алов И. А. Патология митоза / И. А. Алов // Вестник АН СССР. 1965. №11. С. 58—66.
11. Цитогенетические реакции семенного потомства сосны обыкновенной на комбинированное антропогенное загрязнение в районе Новолипецкого металлургического комбината / О. С. Машкина [и др.] // Экологическая генетика. 2009. Т. 7. № 3. С. 17—29.

Белюсов Михаил Владимирович — аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии Воронежского государственного университета; тел. (4732) 208876, e-mail: bmv_happy@mail.ru

Belousov Mikhail V. — post-graduate student of the department of Genetics, Cytology and Bioengineering of Voronezh State University; tel.: (4732) 208876, e-mail bmv_happy@mail.ru

Машкина Ольга Сергеевна — доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии Воронежского государственного университета; тел. (4732) 208876, e-mail: olga_mashkina@yahoo.com

Попов Василий Николаевич — профессор, зав. кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208876, e-mail: pvn@bio.vsu.ru

Mashkina Olga S. — associate professor of the department of Genetics, Cytology and Bioengineering of Voronezh State University; tel.: (4732) 208876, e-mail: olga_mashkina@yahoo.com

Popov Vasily N. — professor, head of the department of Genetics, Cytology and Bioengineering of Voronezh State University; tel.: (4732) 208876, e-mail: pvn@bio.vsu.ru