

36. Kordyum E., Bogatina N. Cyclotron-based effects on plant gravitropism M. Sobol [et al.] // Journal of Advances in Space Reseach. – 2007. – V. 39, №7. – P. 1210–1218.

37. Беикий О.В., Девятков Н.Д., Кислов В.В. Миллиметровые волны низкой интенсивности в медицине и биологии // Биомедицинская радиоэлектроника. – 1998. – № 4.

38. Fesenko E.E., Gluvstein A.Ya. Changes in the state of water, Induced by radiofrequensy electromagnetic fields // FEBS Lett. – 1995. – V. 367. – P.53–55.

39. Лобышев В.И., Рыжиков Б.Д., Шухлинская Р.Э. и др. Собственная люминесценция воды в сильно разбавленных растворах дипептидов // Биофизика. – 1994. – Т.39, №4. – С. 565–570.

40. Сусак И.П., Шигаев А.С., Пономарев О.А., Фесенко Е.Е. Моделирование взаимодействия магнитного поля с объемными вязаными структурами // Математика, компьютер, образование. Ч. 2 / Под ред. Г.Ю. Ризниченко. – М.; Ижевск: Научно-издательский центр «Регулярная и хаотическая динамика», 2002, – С.733–740.

Поступила в редакцию 04.08.2015

УДК (502.5:628.5):635.43

Влияние техногенного пылевого загрязнения на физиологические и цитогенетические характеристики семенного потомства лебеды раскидистой (*Atriplex patula* L.)

Г.В. Филиппова, И.А. Прокопьев, А.А. Шеин

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

*Проведен сравнительный анализ физиологических и цитогенетических характеристик семенного потомства двух групп растений вида *Atriplex patula* L., произрастающих в условиях различных уровней пылевого техногенного загрязнения: 21 ± 1 и 843 ± 41 мг/(м²•сут). В образцах пыли, отобранных на участке с высокой степенью техногенной нагрузки, выявлено увеличение содержания меди в 1,7 раза, цинка в 1,5, кобальта в 2,0, стронция в 1,3 и свинца в 15,3 раза по сравнению с контролем. Показано, что повышенное содержание тяжелых металлов способно вызывать снижение показателей физиологических характеристик семенного потомства – всхожести на 80 % и длины корешка на 30 % относительно контроля. В клетках апикальной меристемы корешков проростков *A. patula* отмечено увеличение в 1,3 раза числа aberrантных клеток на фоне увеличения в 2,6 и 3,0 раза скорости включения ³H-тимидина и ¹⁴C-лейцина в клетки проростков соответственно относительно контроля.*

Ключевые слова: техногенное загрязнение, тяжелые металлы, семенное потомство, всхожесть, молекулярно-генетический аппарат, патологические митозы.

*A comparative analysis of the physiological and cytogenetic characteristics of two *Atriplex patula* seed progeny groups growing under different levels of anthropogenic dust pollution: 21 ± 1 and 843 ± 41 mg / (m² • d) is carried out. The dust samples collected at the site with a high degree of technological load showed an increase in the copper content of 1,7, zinc – 1,5, cobalt – 2,0, strontium – 1,3 and lead – 15,3 times in comparison with the control. It has been shown that high content of heavy metals is can cause a decline in physiological characteristics of seed progeny up to 80% of germination and 30% of the length of rootlets in comparison with control. In the cells of the apical meristem root of *A. patula* seedlings increase of 1,3 times of the number of aberrant cells on the background of increase of 2,6 and 3,0 times of the rate of incorporation of ³H-thymidine and ¹⁴C-leucine into the cells compared with the control seedlings is observed.*

Key words: technogenic pollution, heavy metals, seed progeny, germination, molecular genetic apparatus, abnormal mitosis.

ФИЛИППОВА Галина Валерьевна – к.б.н., с.н.с., nureeva@yandex.ru; ПРОКОПЬЕВ Илья Андреевич – к.б.н., с.н.с., a_prokopiev@mail.ru; ШЕИН Алексей Анатольевич – к.б.н., с.н.с., bg98saa@yandex.ru.

Введение

Известно, что хроническое техногенное загрязнение приводит к накоплению значительного количества ионов тяжелых металлов в системе почва–растение [1]. Длительное воздействие техногенных загрязнителей, в зависимости от дозы, способно вызвать в растительных клетках, как токсические эффекты, так и активировать приспособительные физиологические, цитологические, биохимические и другие реакции [2].

В настоящее время в условиях возрастающего техногенного воздействия на биологические системы для оценки качества среды обитания широко используются методы биотестирования, основанные на ответной реакции живых организмов [3, 4]. Цитогенетический подход при оценке техногенного загрязнения занимает важное место в общей системе биомониторинга окружающей среды и позволяет оценить сочетанное действие всех факторов окружающей среды [5]. И если результатом общего токсического действия поллютантов является элиминация нежизнеспособных особей, то последствия отдаленных эффектов отражаются на состоянии потомства, что приводит к изменению генетического статуса популяции в целом [6]. Изучению ответной реакции растительных организмов в условиях техногенного стресса посвящено много работ. Главным образом, цитологические и физиологические исследования ведутся на хвойных и других древесных видах растений, произрастающих вблизи промышленных предприятий и автомагистралей [3, 4]. Цитогенетические исследования семенного потомства дикорастущих травянистых растений ограничены незначительным количеством видов и в основном проводятся в рамках изучения влияния хронического ионизирующего облучения [7].

Цель работы – изучить физиологические и цитогенетические эффекты, вызванные действием техногенного загрязнения пылью, содержащей повышенные концентрации тяжелых металлов, у семенного потомства лебеды раскидистой (*Atriplex patula* L.), произрастающей в условиях резко континентального климата и многолетней мерзлоты Центральной Якутии.

Материал и методы

Лебеда раскидистая (*Atriplex patula* L.), однолетнее травянистое растение, относится к семейству маревых (*Chenopodiaceae*), растёт вдоль дорог, на сорных, рудеральных местах и солончаковых лугах [8]. Выбор *A. patula* обусловлен тем, что она является полизональным, мезоксерофитным, факультативно синантропным видом растения с большим количеством индивидов в местах компактного произраста-

ния, а также обладает достаточно высокой семенной продуктивностью и полиморфностью [9].

Семена *A. patula* были собраны в 2009 г. на территории и в окрестностях г. Якутска. Контрольная группа растений (n=10) произрастала в условиях с минимальной антропогенной нагрузкой, уровень запыления составлял 20 мг/(м²·сут). Вторая группа материнских особей (n=9) произрастала вблизи автомагистрали с интенсивной нагрузкой и испытывала воздействие техногенного характера, уровень пылевого загрязнения составлял 840 мг/(м²·сут). Сбор семенного потомства проводился индивидуально с каждого материнского растения.

Оценка степени поверхностного пылевого загрязнения была выполнена стандартным методом [10]. С изученных участков были отобраны пробы снежного покрова, глубина которого составляла 30 см, а площадь 0,25 м². После плавления снега воду выпаривали и взвешивали оставшийся осадок, который характеризовал степень пылевого загрязнения участков; расчет производился в мг/(м²·сут). Анализ содержания ряда тяжелых металлов в образцах пыли, отобранных в местах компактного произрастания *A. patula*, был проведен в аналитическом центре Всероссийского геологического института им. А.П. Карпинского методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой с использованием прибора ELEMENT-2 фирмы «Thermo Finnigan» (Германия).

Семена проращивали в чашках Петри на фильтрах по 50 шт. в 4-х повторностях при комнатной температуре (20–24 °С) и 16-часовом световом периоде. Определение лабораторной всхожести и длины корешка проводили на 7-й день с использованием стандартных методов [11].

Исследование на наличие патологических митозов проводилось на корешках проростков длиной 0,8–1,0 см, которые фиксировали смесью 96 %-го этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 в течение 12 ч и далее окрашивали ацетоорсеином. Препараты просматривали под световым микроскопом (Axiostar plus, Carl Zeiss, Германия). Аберрации хромосом (мосты и фрагменты) и нарушения клеточных делений (отставание хромосом) учитывали ана-телофазным методом. Для определения активности деления клеток использовали показатель митотического индекса (%), который определяли отношением числа клеток, находящихся в митозе от их общего числа. Относительную продолжительность фаз митоза (%) оценивали от количества делящихся клеток [12].

Скорость одновременного включения ³Н-тимидина в молекулы ДНК и ¹⁴С-лейцина в молекулы белка меристематических клеток проростков определялась радиоиндикаторным методом с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Rackbeta II фирмы «LKB-Wallac» (Швеция–Финляндия) [13]. Корешки проростков инкубировали 24 ч в среде, содержащей по 100 мкл ³Н-тимидина (2,2 ПБк/моль) и ¹⁴С-лейцина (1,97 ТБк/моль). Далее корешки гомогенизировали в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,4) и центрифугировали 10 мин при 2500 g. Белки и нуклеопротеиды осаждали из супернатанта добавлением 5 %-го раствора ТХУ и отделяли их фильтрованием, после чего определяли интенсивность β-излучения фильтров в толуольном сцинтилляторе.

Значимость отличия от контроля оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (U-критерий) при уровне $p < 0,05$. Расчет стандартной ошибки среднего и коэффициента вариации проводился с помощью пакета AnalystSoft, StatPlus – программа статистического анализа, v.2007.

Результаты и обсуждение

По результатам анализов санитарно-гигиенической оценки состояния почвенного покрова, полученных в лаборатории физико-химических методов анализа ФГНУ ИПЭС, в месте сбора семян *A. patula* (центр г. Якутска) выявлено повышенное содержание подвижных форм меди (до 126 мг/кг при ПДК= 3 мг/кг), цинка (до 383 мг/кг при ПДК=23 мг/кг) и свинца (до 360 мг/кг при ПДК= 6 мг/кг), что, вероятно, обусловлено повышенным более чем в 40 раз уровнем пылевого загрязнения в сравнении с контролем. В пробах почв, собранных с контрольного участка, содержание подвижных форм меди, цинка и свинца не превышало значений ПДК [14].

Пыль, собранная с загрязненного участка, отличалась от контроля по валовому содержанию 4 элементов из 11 исследованных (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Pb, Cd, Sr, Mo; табл. 1). В данной пробе отмечено увеличение содержания меди в 1,7, цинка – в 1,5, кобальта – в 2,0,

Таблица 1

Содержание тяжелых металлов в пыли в зависимости от степени техногенного пылевого загрязнения места произрастания *A. patula* и ПДК в почвах

Образец	Запыление, мг/(м ² ·сут)	Содержание, мг/кг				
		Cu	Zn	Co	Sr	Pb
Контроль	21±1,0	24,4	113,0	4,9	527,0	2,9
Запыление	843±41,0*	40,6	170,0	9,5	668,0	45,0
ПДК (почва)	-	3,0	23,0	-	-	6,0

*Различия статистически значимы по сравнению с контролем $p < 0,05$ (U-критерий).

стронция – в 1,3 и свинца – в 15,3 раза по сравнению с контрольным образцом.

Почва, как и снежный покров, является средой, депонирующей различного рода загрязнители. На территории г. Якутска и его окрестностей имеются все условия для концентрирования различных химических элементов: преобладание мелкодисперсных частиц (в том числе пылевых), активно развивающиеся процессы засоления и подщелачивания среды, наличие мерзлотного горизонта и т.д. [14]. В этой связи определение степени поверхностного пылевого загрязнения позволяет оценить влияние некоторых источников техногенного загрязнения, среди которых большую долю занимает автотранспорт, в формировании ответных физиолого-биохимических реакций биологических систем на примере *A. patula*.

Для выявления адаптивной реакции *A. patula* на действие загрязнения пылью, содержащей тяжелые металлы, были проведены физиологические и цитогенетические исследования ее семенного потомства. Произрастание в условиях техногенной нагрузки вызывает достоверное снижение в 1,8 раза лабораторной всхожести семенного потомства по сравнению с контролем (табл. 2). Коэффициент вариации данного параметра составлял 96,0 %, что на 40,5 % больше, чем в контрольной группе. По длине корешков 7-дневных проростков также наблюдалось достоверное снижение в 1,3 раза среднего значения по выборке по отношению к контролю, при этом коэффициент вариации данного параметра

Таблица 2

Влияние уровня запыления на некоторые физиологические и биохимические показатели проростков семян *A. patula*

	Всхожесть, %	Длина корешка, мм	Скорость включения	
			³ Н-тимидин, фмоль/г сырой массы, сут	¹⁴ С-лейцин, пмоль/г сырой массы, сут
<i>Контроль (21 ± 1 мг/(м²·сут))</i>				
Среднее (n=10)*	15,2±2,4	23,5±2,4	4,3±0,8	4,2±0,8
CV, %	55,5	28,4	59,4	60,3
<i>Запыление (843 ± 41 мг/(м²·сут))</i>				
Среднее (n=9)*	8,4±3,6*	18,3±0,8**	11,0±2,8**	12,4±2,7**
CV, %	96,0	13,4	80,0	67,8

*Количество материнских растений, семена, которых использовались в исследовании. ** Различия статистически значимы по сравнению с контролем $p < 0,05$ (U-критерий).

для варианта с запылением составлял 13,4 %, для контроля – 28,4 %.

Следовательно, высокий уровень запыления 843 мг/(м²·сут) является сильным стресс-фактором, который приводит к значительному снижению и варьированию в широком диапазоне средних значений показателей физиологических характеристик семенного потомства *A. patula*.

Поскольку одним из адаптивных механизмов реагирования на условия обитания и/или стресс является увеличение цитогенетической изменчивости и активности молекулярно-генетического аппарата [4], нами были исследованы: активность молекулярно-генетических процессов (репликация и репарация ДНК, характеризуемые скоростью включения ³H-тимидина и трансляция белка, характеризуемая скоростью включения ¹⁴C-лейцина), митотическая активность апикальной меристемы корешков, а также соотношение фаз митоза и частота встречаемости патологических митозов в клетках корешков проростков семенного потомства *A. patula*.

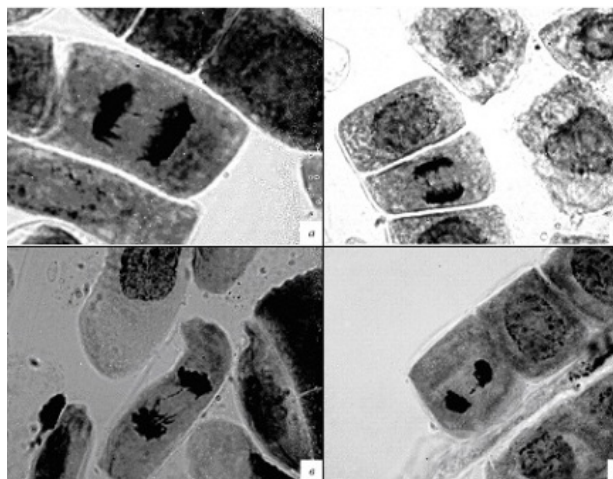
Установлено, что активность молекулярно-генетических процессов в клетках 7-дневных проростков семенного потомства, сформированного в условиях высокой стрессовой нагрузки, была выше контроля в 2,6 и 3,0 раза по включению ³H-тимидина и ¹⁴C-лейцина соответственно. Отмечена высокая вариабельность показателя активности данных процессов у семенного потомства внутри контрольной группы, а повышение интенсивности пылевого загрязнения приводит к еще большему диапазону колебаний по этой выборке (табл.2), что указывает на формирование адаптивных процессов, позволяющих расширить популяционный диапазон устойчивости семенного потомства к экстремальным условиям произрастания [2].

Следует отметить, что показатель митотической активности клеток корневой меристемы в контрольной выборке варьировал от 3,5 до 3,9%, в варианте с запылением – от 4,0 до 4,4 %. Можно предположить, что увеличение значения митотического индекса при уровне пылевого загрязнения 840 мг/(м²·сут) вызвано скорее не усилением митотической активности клеток, а задержкой в прохождении фаз митоза. Так, среди делящихся клеток увеличивается относительная доля тех, которые пребывают на стадии анафазы. Очевидно, это является следствием возникновения большего числа патологических митозов, которые нарушают течение этой стадий деления и задерживают цитокинез (табл.3).

Повышение в 1,1 раз митотического индекса клеток корешков и уменьшение в 1,3 раза длины

7-дневных корешков на фоне значительного повышения в 2,6 раз скорости включения ³H-тимидина может указывать на превалирование механизмов матричных процессов, направленных на репарацию ДНК относительно контроля, у проростков семенного потомства, сформированного в условиях техногенного пылевого загрязнения. В свою очередь, повышение в 3,0 раза скорости включения ¹⁴C-лейцина указывает на усиление процесса трансляции белка в клетках исследованных проростков, что, возможно, связано с более активным замещением или восстановлением поврежденных белков и клеточных структур [15].

При цитологическом исследовании делящихся клеток корневой меристемы проростков *A. patula* были обнаружены клетки со следующими видами нарушений: хромосомные и хроматидные мосты, одиночные фрагменты, отстающие хромосомы (рисунок). Эти виды патологических митозов были характерны как для контрольной выборки, так и для выборки с запылением. В контроле доля клеток с аномалиями составляла 10 %, из них (в пересчете на 100 % аномальных): 69 % – отстающие хромосомы, 30 % – мосты, 1 % – фрагменты. В апикальной меристеме корешков проростков семян, сформированных в условиях интенсивного запыления, доля клеток с аномалиями составляла 13 %, из которых клеток с отстающими хромосомами (в пересчете на 100 % аномальных) – 69 %, мостами – 24 %, число клеток с фрагментами выросло до 7 %, что согласуется с цитогенетическими исследованиями по влиянию тяжелых металлов на растения [16].



Хромосомные аномалии в анаелофазах митоза *A. patula*: а – одиночный фрагмент; б – хромосомный мост; в – хроматидный мост; г – отстающая хромосома. Об. 100х, ок. 16х

Заключение

Таким образом, произрастание *A. patula* в условиях интенсивного пылевого загрязнения с высоким содержанием тяжелых металлов приводит к снижению на 80 % всхожести семенного потомства и вызывает замедление на 30 % интенсивности ростовых процессов у проростков относительно контроля. Возможно, задержка в росте на начальных этапах формирования корневой системы является следствием нарушения процессов клеточного деления. Так, в корешках проростков отмечено повышение в 1,3 раза числа патологических митозов, выраженное в увеличении числа фрагментов в анаелофазах деления, относительно контроля. Повышение в 2,6 раз и в 3,0 раза скорости включения ³H-тимидина и ¹⁴C-лейцина в клетки проростков соответственно указывает на превалирование у них процессов, направленных на репарацию ДНК и усиление процесса трансляции белка, что, по-видимому, позволяет обеспечить устойчивость и выживание *A. patula* в условиях техногенного загрязнения среды.

Литература

1. Ларина Г.Е., Обухов А.И. Тяжелые металлы в растительности с газонов вдоль автомагистралей // Вестник МГУ. – 1995. – Сер. 17, №3. – С. 41–48.
2. Прокотьев И.А., Журавская А.Н., Филиппова Г.В. Изменчивость биохимических параметров и радиустойчивость семенного потомства дескурайнии гулявниковой и клоповника безлепестного под действием различных факторов // Экология. – 2011. – № 4. – С. 259–265.
3. Буторина А.К., Калаев В.Н., Карпова С.С. Цитогенетические нарушения в соматических клетках человека и березы повислой в районах г. Воронежа с различной интенсивностью антропогенного загрязнения // Экология. – 2002. – № 6. – С. 438–441.
4. Калашиник Н.А. Характеристика естественных насаждений хвойных видов южного Урала по цитогенетическим показателям // Вестник ОГУ. – 2009. – № 6. – С. 157–160.
5. Калаев В.Н., Карпова С.С. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма: Учебное пособие. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 2004. – 80 с.
6. Горовая А.И., Бобырь Л.Ф., Скворцова Т.В. Методологические аспекты оценки мутагенного фона и генетического риска для человека и биоты от действия мутагенных экологических факторов // Цитология и генетика. – 1996. – Т. 30. №6. – С. 78–86.
7. Евсеева Т.И., Гераськин С.А., Фролова Н.П., Храмова Е.С. Использование природных популяций *Taraxacum officinale* Wigg. для оценки состояния техногенно нарушенных территорий // Экология. – 2002. – Т. 33, № 5. – С. 370–373.
8. Иванова В.П. Двудольные растения окрестностей г. Якутска (определитель). – Якутск: ЯГУ, 1990. – 160 с.
9. Черосов М.М., Слепцова Н.П., Миронова С.И. и др. Синтаксономия синантропной растительности Якутии. – Якутск: Изд-во ЯНЦ СО РАН, 2005. – 575 с.
10. Василенко В.Н., Назаров И.Н., Фридман Ш.Б. Мониторинг загрязнения снежного покрова. – Л.: Гидрометеиздат, 1985. – 182 с.
11. Вавилов П.П., Гриценко В.В., Кузнецов В.С. Практикум по растениеводству. – М.: Колос, 1983. – 352 с.
12. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1974. – 288 с.
13. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. – М.: Наука, 1983. – 304 с.
14. Сивцева Н.Е., Легостаева Я.Б., Макаров В.С., Васильев Н.Ф. Экологическая оценка состояния территории г. Якутска по суммарному показателю загрязнения почвенного покрова // Вестник СВФУ. – 2011. – Т. 8, № 2. – С. 30–35.
15. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. – М.: КДУ, 2007. – 140 с.
16. Chandraa S. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test // Science of the Total Environment. – 2005. – Vol. 347, – P. 46–52.

Поступила в редакцию 02.06.2015