

© М.Ю. Медведева,
А.Я. Болсуновский

ФГБУН «Институт биофизики
СО РАН», Красноярск

Показано изменение спектра хромосомных аномалий в корневой меристеме *Elodea canadensis* Michx. (элодея канадская), произрастающей в районах с разными типами техногенного загрязнения (радиационного и химического) донных отложений реки Енисей. В пробах элодеи, собранной в зоне радиоактивного загрязнения реки сбросами Горно-химического комбината Росатома (г. Железногорск), преобладающим типом аномалий были хромосомные aberrации (мосты, агглютинация, фрагментация хромосом), а также множественные аномалии в одной клетке. В пробах элодеи из районов реки Енисей с нерадиоактивным (химическим) загрязнением донных отложений предприятиями г. Красноярска преобладали аномалии, связанные с нарушением митотического веретена деления клетки.

✿ **Ключевые слова:** генотоксичность; аномалии митоза; *Elodea canadensis*; техногенное загрязнение донных отложений; река Енисей.

СПЕКТР ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЕ *E. CANADENSIS* ИЗ РАЙОНОВ РЕКИ ЕНИСЕЙ С РАЗНЫМИ ТИПАМИ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Цитогенетические нарушения в корневой меристеме растений используются как показатели генотоксичности при оценке качества среды обитания [12–14, 19, 22]. Водные виды растений сравнительно недавно стали применяться в качестве биоиндикаторов техногенного загрязнения, и цитогенетические работы с их использованием немногочисленны [13, 16]. К числу массовых видов макрофитов, вегетирующих в районе реки Енисей, как в зоне техногенного загрязнения, так и на фоновых участках, относится *Elodea canadensis* Michx. (элодея канадская) [8]. В результате ряда исследований в 2003–2006 гг. [10, 16] и в 2011–2012 гг. [26] были подробно изучены цитогенетические характеристики элодеи канадской. Было также показано значительное возрастание частоты цитогенетических аномалий в клетках элодеи, вегетирующей в зоне радиоактивного загрязнения Горно-химического комбината Росатома (ГХК, г. Железногорск). Целью настоящего исследования была оценка спектра aberrаций в корневой меристеме элодеи в зависимости от типа техногенного загрязнения реки Енисей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы элодеи отбирались в 2012–2013 гг. в реке Енисей на участке протяженностью до 330 км по течению реки от г. Красноярска до устья реки Ангара. Сравнивались пробы из 5 районов реки Енисей, контрастных по уровню техногенного загрязнения. Три района отбора располагались выше по течению реки Енисей от ГХК: Красноярск-1 — район пос. Удачный, расположен в 14 км выше по течению реки от г. Красноярска (контрольный район), в 94 км от ГХК; Красноярск-2 — район расположен в центре г. Красноярска (о. Татышев, 0 км), в 80 км от ГХК; Красноярск-3 — район с. Есаулово, расположен на 43 км ниже по течению от г. Красноярска и на 37 км выше ГХК. Два из трех вышеупомянутых районов реки Енисей подвержены химическому загрязнению от промышленно-коммунального комплекса г. Красноярска и его окрестностей [26]. В предыдущих исследованиях [26] было выявлено повышенное содержание некоторых металлов (Cu, Zn, Pb, Ni) в донных отложениях реки ниже г. Красноярска, причем зарегистрированные концентрации тяжелых металлов превышали пороговый уровень концентрации, при которой токсические эффекты для пресноводных бентосных организмов маловероятны (ТЭС, *threshold effect concentration*) [25].

Два других района отбора (вблизи сел Атаманово и Стрелка) располагались в зоне влияния ГХК на участках реки Енисей, загрязненных техногенными радионуклидами. Исследуемые участки различались как по интенсивности загрязнения, так и по спектру техногенных радионуклидов. Район отбора Атаманово расположен на 87 км ниже по течению реки от г. Красноярска и в 7 км от сбросов ГХК. Донные отложения, отобранные в этом районе в 2012 г., содержали до 5 техногенных радионуклидов ($^{152, 154}\text{Eu}$, ^{137}Cs , ^{60}Co и ^{241}Am), при этом доля ^{137}Cs составляла около 30 % от суммарной активности техногенных радионуклидов. Район отбора Стрелка расположен на расстоянии 244 км по течению реки от ГХК (324 км от Красноярска). В данном районе обнару-

Поступила в редакцию 02.06.2015
Принята к публикации 04.06.2016

жены радиоактивные аномалии в слоях почвы и донных отложениях, характеризующиеся высокой активностью ^{137}Cs (до 2,6 кБк/кг), доля которого составляла до 99 % от суммарной активности радионуклидов [26]. Активность техногенных радионуклидов в донных отложениях из района Стрелка была в 10 раз выше, чем в пробах донных отложений из района Атаманово [26].

Пробы корней элодеи канадской собирали в период массовой вегетации (пробы Красноярск-1 и -3 — в июне; Красноярск-2, Атаманово и Стрелка — в сентябре) в прибрежной зоне реки на глубине до 0,5 м. В каждом районе исследования было взято не менее 200 молодых корешков элодеи, по 1–2 корня с каждого растения. Из заготовленного количества корней далее случайным образом отбиралось 20–30 штук для микроскопирования. Корни фиксировали в смеси 96 % этанола и ледяной уксусной кислоты (3:1) сразу после отбора и отделения от растений. Через несколько суток корни окрашивали 1 % ацетоорсеином: 1 г $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7$ (СИНБИАС, Украина) на 100 мл 45 % CH_3COOH (ХЧ, ООО «Лега», г. Дзержинск, Россия). Корни помещали в фарфоровый тигель с ацетоорсеином, тигель накрывали часовым стеклом и нагревали 2–3 раза над пламенем спиртовки до появления конденсата на стекле, но не доводя до кипения. Затем корни помещали в свежий раствор красителя и выдерживали в этом растворе в течение 1–2 суток при 4 °С для получения интенсивного окрашивания хромосом. Окрашенные кончики корней (длиной до 2 мм) раз-

давливали на предметном стекле в капле 45 % раствора уксусной кислоты до равномерного распределения клеток апикальной меристемы.

Полученные временные препараты просматривали сразу после их приготовления с помощью микроскопа Olympus CX31 (Япония) при увеличении $\times 900$ раз и фотографировали. Для микрофотосъемки использовали цифровой фотоаппарат SONY (12 Мпикс) с оптическим увеличением в 4 раза. Аномалии в делящихся клетках исследовали на стадиях метафазы и анателофазы клеточного цикла. Для каждой точки отбора элодеи анализировали не менее 20 апикальных корневых меристем (1–2 тыс. делящихся клеток на каждой стадии клеточного цикла). Оценивали частоту встречаемости клеток с абберациями как отношение числа клеток, содержащих аномалию к общему числу просмотренных клеток в метафазе или анателофазе (в %). Частота встречаемости аббераций рассчитывалась для каждого препарата, затем вычислялась средняя частота на все просмотренные препараты корней. Суммарная частота абберантных клеток (табл. 1 и 2) вычислялась как сумма частот встречаемости отдельных типов аббераций. Долю клеток с отдельным типом аббераций рассчитывали как отношение числа клеток с данным типом аномалии к суммарному числу аномальных клеток в метафазе или анателофазе и выражали в процентах. Сравнивали частоту клеток с абберациями в пробах из различных районов по двухвыборочному t -критерию Стьюдента с различными ди-

Таблица 1

Частота встречаемости (среднее \pm SE) и доля клеток с цитогенетическими аномалиями на стадии метафазы в апикальной корневой меристеме *Eloдея canadensis* из различных районов реки Енисей, %
The frequency of the occurrence (mean \pm SE) and percentage of metaphase cells with cytogenetic abnormalities in the apical root meristem of *E. canadensis* from different areas of the Yenisei River, %

Район исследования (км по течению от г. Красноярска)	Число проанализированных препаратов (корешков), шт.	Исследовано метафаз, шт.	Суммарная частота абберантных клеток, %	Частота встречаемости клеток с отдельными аномалиями (доля клеток с аномалиями), %						
				выброс хромосомы	дезоригированные хромосомы	агглютинация	кольцевая хромосома	остаточное ядрышко	множественные аномалии	прочие*
Красноярск-1 (-14)	23	1263	9,0 \pm 1,0	7,3 \pm 0,9 (81,1)	1,4 \pm 0,4 (15,6)	0,1 \pm 0,1 (1,4)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,1 \pm 0,1 (0,7)	0,1 \pm 0,1 (1,1)
Красноярск-2 (0)	19	574	9,4 \pm 1,5	6,5 \pm 1,4 (68,9)	1,1 \pm 0,5 (11,6)	1,0 \pm 0,4 (10,4)	0,1 \pm 0,1 (1,1)	0,2 \pm 0,2 (2,2)	0,1 \pm 0,1 (0,9)	0,5 \pm 0,4 (4,9)
Красноярск-3 (43)	29	2100	4,4 \pm 0,6	2,7 \pm 0,5 (60,4)	0,1 \pm 0,1 (1,4)	1,1 \pm 0,2 (25,2)	0,0 (0)	0,4 \pm 0,2 (8,5)	0,1 \pm 0,1 (1,5)	0,1 \pm 0,1 (2,9)
Атаманово (87)	25	2197	15,4 \pm 1,8	4,6 \pm 0,5 (29,6)	0,04 \pm 0,04 (0,3)	6,1 \pm 1,0 (39,6)	0,3 \pm 0,1 (2,0)	0,2 \pm 0,1 (1,0)	0,7 \pm 0,2 (4,4)	3,5 \pm 1,1 (23,0)
Стрелка (324)	24	1561	10,7 \pm 1,0	5,8 \pm 0,7 (54,4)	0,6 \pm 0,2 (5,3)	2,3 \pm 0,6 (21,1)	0,4 \pm 0,2 (3,4)	0,7 \pm 0,3 (6,5)	0,2 \pm 0,1 (2,0)	0,8 \pm 0,2 (7,4)

Жирным шрифтом обозначены средние значения, достоверно отличающиеся от значений для контрольного района «Красноярск-1» при $p < 0,05$; жирным шрифтом с подчеркиванием — при $p < 0,005$. Примечание: * в число прочих аномалий были включены клетки с фрагментацией хромосом, для района Атаманово частота клеток с фрагментацией составляла $2,0 \pm 0,5$ % (14 % доля клеток с данной аномалией)

Таблица 2

Частота встречаемости (среднее ± SE) и доля клеток с цитогенетическими аномалиями на стадии анателофазы в апикальной корневой меристеме *Elodea canadensis* Michx. из различных районов реки Енисей, %
The frequency of the occurrence (mean ± SE) and percentage of ana-telophase cells with cytogenetic abnormalities in the apical root meristem of *E. canadensis* from different areas of the Yenisei River, %

Район исследования (км по течению от г. Красноярск)	Число проанализированных препаратов (корешков), шт.	Исследовано клеток в анателофазе, шт.	Суммарная частота аберрантных клеток, %	Частота встречаемости клеток с аномалиями (доля клеток с аномалиями), %						
				мост единичный	мосты множественные	дезорientированные хромосомы и фрагменты	асимметричный и многополюсный митоз	агглютинация	множественные аномалии	прочие *
Красноярск-1 (-14)	23	1069	5,2 ± 0,6	1,5 ± 0,4 (28,7)	0,6 ± 0,3 (11,6)	1,8 ± 0,5 (34,1)	1,3 ± 0,3 (25,6)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Красноярск-2 (0)	19	453	12,3 ± 2,1	2,3 ± 1,1 (18,4)	0,5 ± 0,3 (3,7)	3,3 ± 1,0 (26,5)	3,9 ± 1,6 (31,5)	1,4 ± 0,6 (11,1)	0,7 ± 0,4 (6,0)	0,4 ± 0,3 (2,8)
Красноярск-3 (43)	29	1577	6,7 ± 0,7	2,9 ± 0,5 (43,1)	1,6 ± 0,5 (24,7)	1,5 ± 0,4 (22,3)	0,3 ± 0,1 (4,0)	0,1 ± 0,1 (0,7)	0,1 ± 0,1 (1,5)	0,2 ± 0,2 (3,7)
Атаманово (87)	25	1592	10,7 ± 1,1	3,6 ± 0,5 (33,8)	1,5 ± 0,4 (13,7)	2,7 ± 0,4 (25,3)	1,4 ± 0,3 (12,6)	0,0 (0)	0,5 ± 0,4 (4,4)	1,0 ± 0,5 (10,2)
Стрелка (324)	22	1566	34,5 ± 5,0	9,2 ± 1,6 (26,5)	10,2 ± 2,0 (29,7)	6,1 ± 1,4 (17,6)	1,8 ± 0,8 (5,1)	2,5 ± 0,9 (7,4)	2,9 ± 0,9 (8,4)	1,8 ± 0,6 (5,3)

Жирным шрифтом обозначены средние значения, достоверно отличающиеся от значений для контрольного района «Красноярск-1» при $p < 0,05$; жирным шрифтом с подчеркиванием — при $p < 0,005$. Примечание: * прочие аномалии включают кольцевые хромосомы и остаточные ядрышки в анателофазе

сперсиями [6] с помощью программы MS Excel 2007. Результаты приведены как $M \pm SEM$ (среднее и стандартная ошибка среднего).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Аномалии клеток на стадии метафазы

В корневой меристеме элодеи канадской из исследуемых районов реки Енисей был зарегистрирован широкий спектр цитогенетических аномалий на стадиях метафазы и анателофазы клеточного цикла. На рисунке 1, а представлен вид метафазной клетки в норме, на рисунках 1, b–h — фото аномальных клеток элодеи на стадии метафазы. Обнаружены следующие типы аномалий: дезориентированные хромосомы (рис. 1, b), выброс отдельных хромосом за веретено деления (так называемая «блуждающая хромосома», рис. 1, c), агглютинация (склеивание) хромосом (рис. 1, d), кольцевая хромосома (рис. 1, e) и клетки с остаточным ядрышком в метафазе (рис. 1, f). В отдельную категорию были выделены клетки с множественными нарушениями, т. е. клетки с сочетанием разных типов аберраций (например, выброс и агглютинация хромосом, рис. 1, g). В категорию «прочие аберрации» были отнесены клетки с фрагментацией хромосом, с микроядрами в метафазе (рис. 1, h), а также клетки с неизвестным типом аберраций, классификация которых была затруднительна.

В таблице 1 представлена средняя частота встречаемости и доля клеток с отдельными типами аберраций на стадии метафазы в корнях элодеи из различных районов реки Енисей. Наиболее распространенным видом аномалий в метафазе было нарушение расхождения хромосом: на долю клеток с выбросом одиночной хромосомы приходилось от 30 до 81 % аномальных клеток, на долю клеток с дезориентированными хромосомами — от 0,3 до 16 % (см. табл. 1). Высокий процент клеток с данным типом аномалий наблюдался в пробах элодеи, отобранных в пределах г. Красноярск (Красноярск-1–3), т. е. в районах с химическим загрязнением. Клетки с агглютинацией хромосом составляли от 2 до 40 % от всех клеток с аберрациями, максимальный процент клеток с подобной аномалией зарегистрирован в ближней зоне влияния ГХК (Атаманово). Клетки с остаточным ядрышком в метафазе обнаружены в корнях элодеи из четырех исследуемых районов (кроме Красноярск-1), доля клеток с этой аномалией достигала 9 % от суммы аномальных клеток в пробе Красноярск-3. Кольцевая хромосома в метафазе зарегистрирована в корнях элодеи из трех исследуемых районов — из зоны радиационного загрязнения (Атаманово и Стрелка) и центра г. Красноярск (Красноярск-2). Доля клеток с кольцевой хромосомой достигала 3 % от числа аномальных клеток в пробах элодеи, собранной на донных отложениях реки Енисей с самым высоким содержанием техногенных радионуклидов

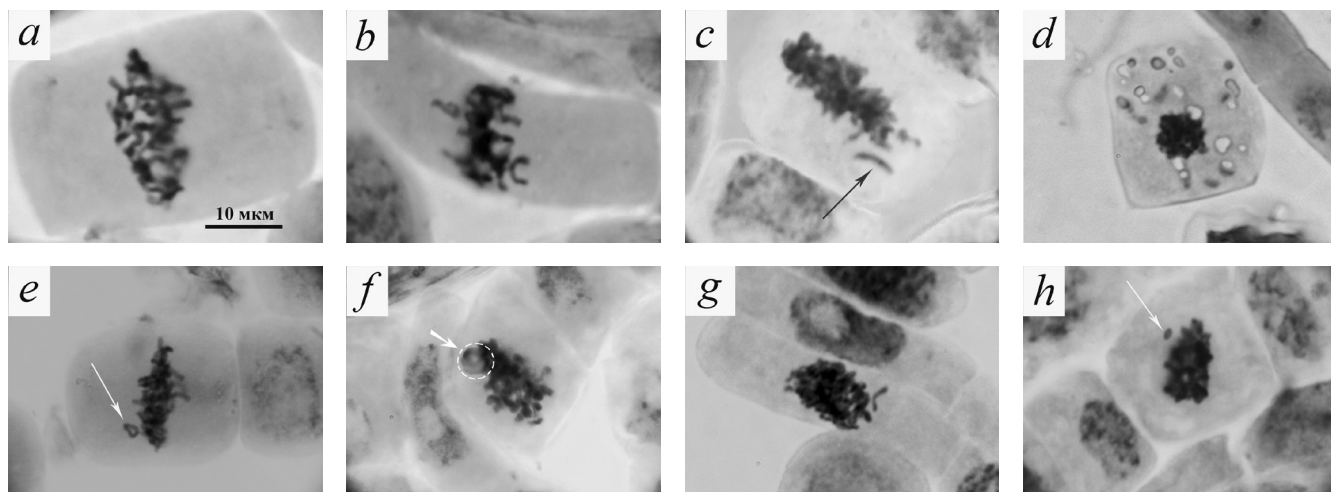


Рис. 1. Типы цитогенетических аномалий, встречающиеся в метафазных клетках апикальной корневой меристемы *Elodea canadensis* из реки Енисей: *a* — нормальная метафаза; *b* — дезориентированные хромосомы; *c* — выброс одиночной хромосомы; *d* — агглютинация; *e* — кольцевая хромосома (показана стрелкой); *f* — остаточное ядрышко (показано стрелкой); *g* — клетка с множественными нарушениями (выброс и агглютинация хромосом); *h* — прочие нарушения (микроядро)

Fig. 1. The types of cytogenetic abnormalities observed in metaphase cells of the apical root meristem of *E. canadensis* from the Yenisei River: (*a*) — normal metaphase; (*b*) — disoriented chromosomes; (*c*) — vagrant chromosome; (*d*) — agglutination; (*e*) — ring chromosome (shown by arrow); (*f*) — residual nucleolus (shown by arrow); (*g*) — multiple abnormalities in the cell (vagrant chromosome and agglutination); (*h*) — other abnormalities (micronucleus)

(Стрелка). Доля клеток с множественными абберациями составляла от 1 до 4 % от числа аномальных клеток. На долю клеток с прочими абберациями приходилось от 1 до 7 % абберантных клеток, за исключением элодеи из района Атаманово, где на долю этого типа аббераций приходилось 23 % аномальных клеток (из них 14 % составляли клетки с фрагментацией хромосом).

Расчет средней частоты встречаемости отдельных типов аббераций в корневых меристемах элодеи из различных районов (в процентах к сумме исследованных метафазных клеток) показал, что спектр аббераций в клетках элодеи менялся по течению реки Енисей (см. табл. 1). Так, в корнях элодеи из района Красноярск-1 (выше по течению от г. Красноярска) средняя частота встречаемости клеток с дезориентированными хромосомами в метафазе была в 1,3–14 раз выше, чем в образцах из других районов (достоверно для Красноярска-3 и Атаманово при $p < 0,01$). В пробах элодеи, вегетирующей вблизи сбросов ГХК (Атаманово), средняя частота встречаемости клеток с агглютинацией хромосом была в 3–60 раз выше, чем в пробах из других районов (достоверно при $p < 0,005$), клеток с множественными аномалиями — в 3,5–7 раз выше (достоверно при $p < 0,01$) (рис. 2). Также в корневой меристеме элодеи из района Атаманово зарегистрировано 2 % клеток с фрагментацией хромосом в метафазе, что не наблюдалось в пробах из других районов.

Аномалии клеток на стадии анателофазы

На рисунках 3, *b–t* приведены типы цитогенетических аномалий, встречающихся на стадиях анафазы и те-

лофазы клеточного цикла в корнях элодеи, на рисунке 3, *a* показан вид анафазной клетки в норме. Зарегистрированы следующие типы цитогенетических нарушений: мосты (разорванные и целые, одиночные и множественные, рис. 3, *b–d*), дезориентированные хромосомы (включая выброс и отставание хромосом, рис. 3, *e*), агглютинация хромосом (рис. 3, *f*), клетки с асимметричным (рис. 3, *g*) и многополюсным (рис. 3, *h–h'*) митозом, а также клетки с множественными аномалиями (рис. 3, *i–j*). К прочим абберациям были отнесены редкие типы аномалий (кольцевая хромосома — рис. 3, *k*; клетки с остаточным ядрышком — рис. 3, *l*; фрагментация хромосом — рис. 3, *m* и абберации невыясненной природы).

Значительную долю нарушений в анателофазе занимали мосты, на долю единичных мостов приходилось от 18 до 43 % аббераций, на долю множественных мостов — от 4 до 28 % (включая разорванные мосты, см. табл. 2). Повышенный процент клеток с множественными мостами отмечен в пробах элодеи, вегетирующей ниже по течению от г. Красноярска (Красноярска-3) и в районе ^{137}Cs -аномалии (Стрелка). На долю клеток с дезориентированными хромосомами приходилось от 19 до 34 % всех аббераций, чаще всего встречалось отставание хромосом в анателофазе (см. табл. 2). На долю клеток с агглютинацией хромосом и с множественными аномалиями приходилось 1–11 и 2–11 % всех аббераций соответственно. Чаще всего клетки с этими типами аномалий встречались в центре г. Красноярска (Красноярска-2), а также в районе аномалии на Стрелке (см. табл. 2). В пробах из г. Красноярска (Красно-

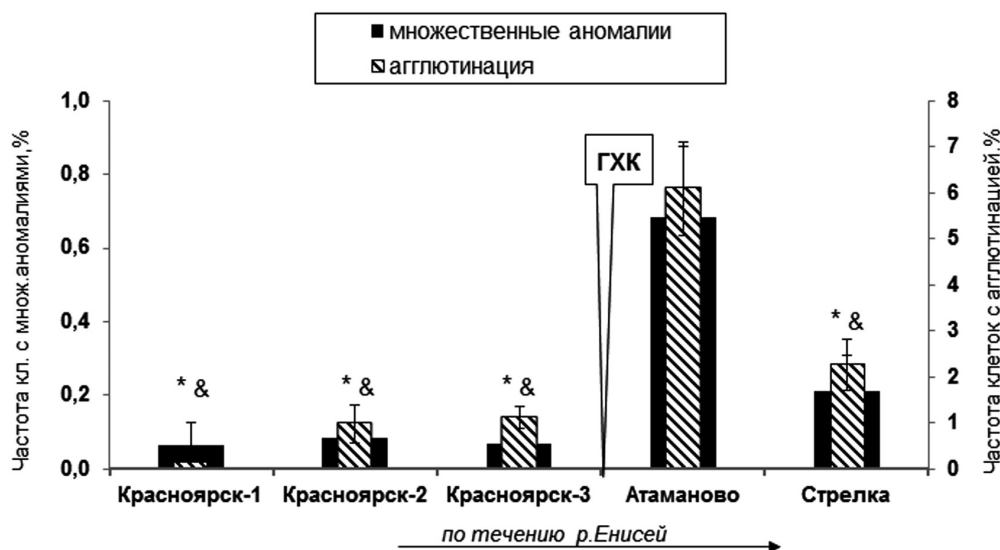


Рис. 2. Частота встречаемости клеток с агглютинацией хромосом, а также клеток с множественными аномалиями в метафазе — в апикальной корневой меристеме *E. canadensis* по течению реки Енисей (% , среднее \pm SE). Условные обозначения: * (значения для множественных аномалий при $p < 0,01$), & (значения для агглютинации при $p < 0,005$) достоверно отличаются от пробы из района Атаманово

Fig. 2. The frequency of the occurrence of metaphase cells with chromosome agglutination and multiple abnormalities in apical root meristem of *E. canadensis* downstream of the Yenisei River (% , mean \pm SE). Notations: * (values for multiple abnormalities, $p < 0.01$), & (values for agglutination, $p < 0.005$) significantly different from the sample of site Atamanovo, according to Student's t-test

ярк-1–2) до 30 % аномалий в анаметофазе занимали многополюсные и асимметричные митозы. В остальных пробах элодеи доля клеток с данными аномалиями не превышала 13 % (см. табл. 2).

Расчет средней частоты встречаемости клеток с отдельными типами аберраций в анаметофазе показал, что в образцах элодеи из дальней зоны ГХК (Стрелка) частота клеток с одиночными и множественными мостами в 3–6 раз и 6–20 раз соответственно выше этого показателя для остальных районов (достоверно при $p < 0,005$) (рис. 4). Частота встречаемости клеток с дезориентированными хромосомами и фрагментами хромосом (в данной работе фрагменты хромосом отдельно не учитывались) в корнях элодеи из района Стрелки в 2–4 раза превышала этот показатель для других районов (достоверно по всем средним при $p < 0,05$, кроме Красноярска-2) (см. табл. 2). Также в корнях элодеи из этого района зарегистрирована повышенная частота клеток с множественными аномалиями (в 4–29 раз выше, чем в остальных районах, достоверно при $p < 0,05$). Многополюсные и асимметричные митозы, напротив, встречались чаще в центре г. Красноярска (Красноярск-2), чем в зоне влияния ГХК (см. табл. 2). В клетках корневой меристемы элодеи на стадии анаметофазы были обнаружены остаточные ядрышки и кольцевые хромосомы (за исключением района Красноярск-1), однако различия по частоте их встречаемости в образцах из различных районов были недостоверны (при $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованный нами участок реки Енисей (отг. Красноярска до устья реки Ангары) подвержен техногенному загрязнению двух типов: радиоактивному — от предприятий ГХК и химическому — от промышленно-коммунального, транспортного и сельскохозяйственного комплексов г. Красноярска и других населенных пунктов, находящихся в зоне водосбора. Оба фактора — радиационный и химический — могут оказывать генотоксическое действие на растительные клетки и вызывать появление цитогенетических нарушений в меристеме.

По литературным данным, аберрации хромосомного типа (кольца, фрагменты, двойные мосты) считаются маркерами радиационного воздействия [19, 22, 20]. Поскольку хромосомы элодеи канадской очень мелкие (длина — 1–2,5 мкм, ширина — 0,7–1 мкм), однозначно идентифицировать фрагменты и двойные мосты было затруднительно даже с использованием иммерсионного объектива $\times 100$. В данном исследовании отстающие хромосомы и их фрагменты подсчитывались суммарно, а мосты разделялись на два типа — одиночные и множественные. В дальнейшей работе на корнях элодеи проводился подсчет одиночных и двойных фрагментов в клетках, при этом идентифицировать фрагменты можно было только субъективно — по относительному их размеру и форме (целые хромосомы — двулучие, фрагменты — палочковидные) [26].

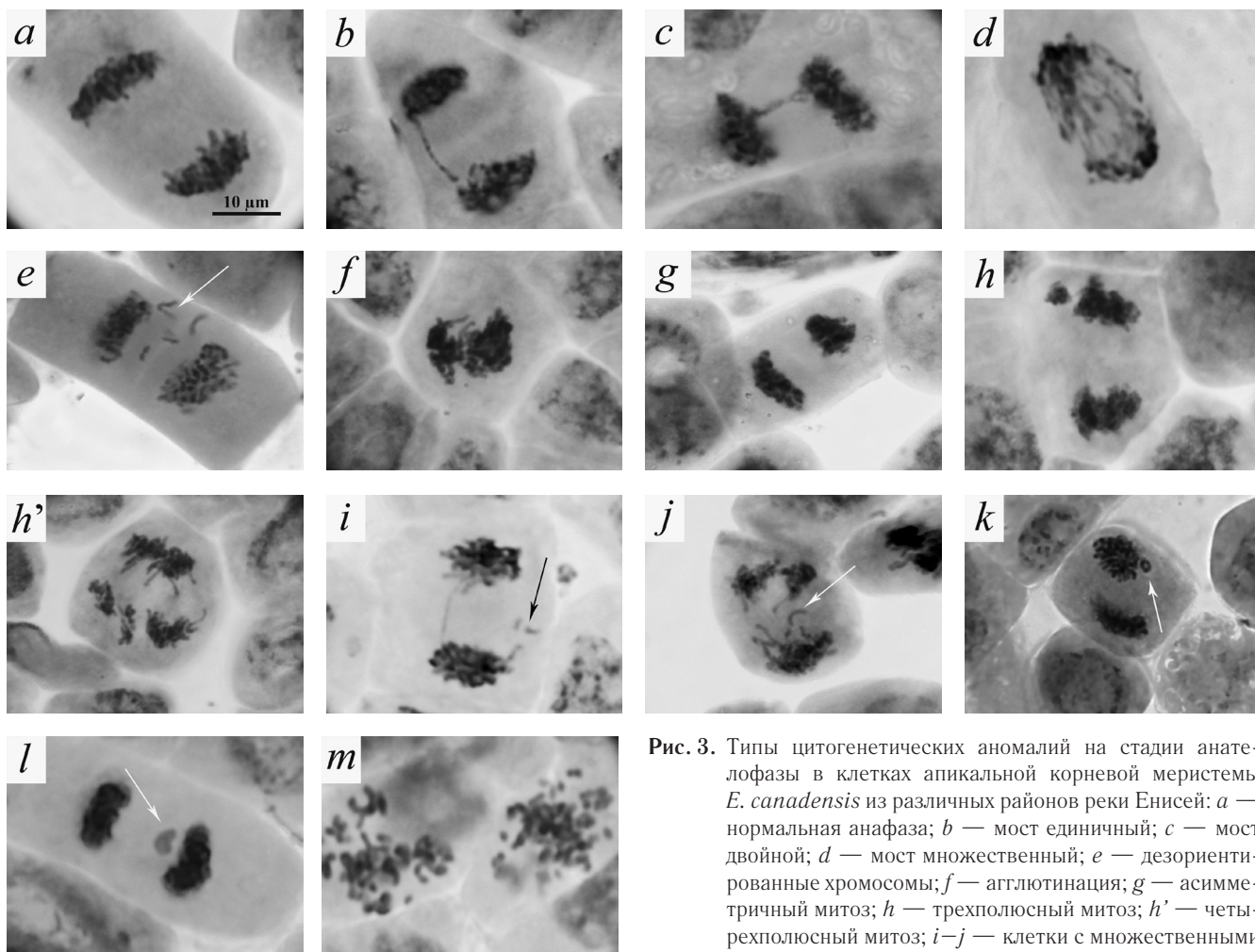


Рис. 3. Типы цитогенетических аномалий на стадии ана-телофазы в клетках апикальной корневой меристемы *E. canadensis* из различных районов реки Енисей: *a* — нормальная анафаза; *b* — мост единичный; *c* — мост двойной; *d* — мост множественный; *e* — дезориентированные хромосомы; *f* — агглютинация; *g* — асимметричный митоз; *h* — трехполюсный митоз; *h'* — четырехполюсный митоз; *i-j* — клетки с множественными аберрациями (*i* — двойной фрагмент и мост; *j* — трех-

полюсный с отстающей хромосомой); *k* — кольцевая хромосома; *l* — остаточное ядрышко; *m* — прочие аберрации (фрагментация хромосом)

Fig. 3. The types of cytogenetic abnormalities observed in ana-telophase cells of the apical root meristem of *E. canadensis* from the Yenisei River: (*a*) — normal anaphase; (*b*) — single bridge; (*c*) — double bridge; (*d*) — multiple bridges; (*e*) — disoriented chromosomes; (*f*) — agglutination; (*g*) — unequal chromosome disjunction (*h*) — tripolar chromosome disjunction; (*i*) — tetrapolar chromosome disjunction; (*j-k*) — multiple abnormalities in the cell (*j* — double fragment and bridge; *k* — tripolar chromosome disjunction and vagrant chromosome); (*l*) — ring chromosome; (*m*) — residual nucleolus; (*n*) — other abnormalities (chromosome fragmentation)

Кольцевые хромосомы были зарегистрированы в пробах элодеи из реки Енисей — в трех исследуемых районах (Красноярск-2, Атаманово, Стрелка) на стадии метафазы и только в ближней зоне ГХК (Атаманово) — на стадии анателофазы. Максимальная частота встречаемости кольцевых хромосом в метафазе из районов с радиоактивным загрязнением была 0,4 %, из района Красноярск-2 — 0,1 %, однако достоверных различий между пробами не показано. Считается, что образование центрических колец связано с локальными разрывами хромосом в результате воздействия ионизирующего излучения [11], при этом происходит обмен участками двух плечей одной и той же хромосомы со слиянием ее проксимальных концов. Кольцевые хромосомы реги-

стрировались также в клетках лука [15] под действием побочных продуктов хлорирования воды и в лимфоцитах человека [11, 29] в результате воздействия радиационного фактора.

Частота клеток с одиночными и множественными мостами в корнях элодеи, собранных на участке с повышенной активностью ^{137}Cs в донных отложениях реки Енисей (Стрелка), была самой высокой. Мосты могут появиться как в результате разрыва и воссоединения разорванных концов хромосом, так и вследствие агглютинации (слипания) хромосом [7, 24, 33, 43]. Преобладание мостов в спектре патологий митоза может свидетельствовать об интенсивном протекании процессов репарации ДНК в условиях стрессового воздействия

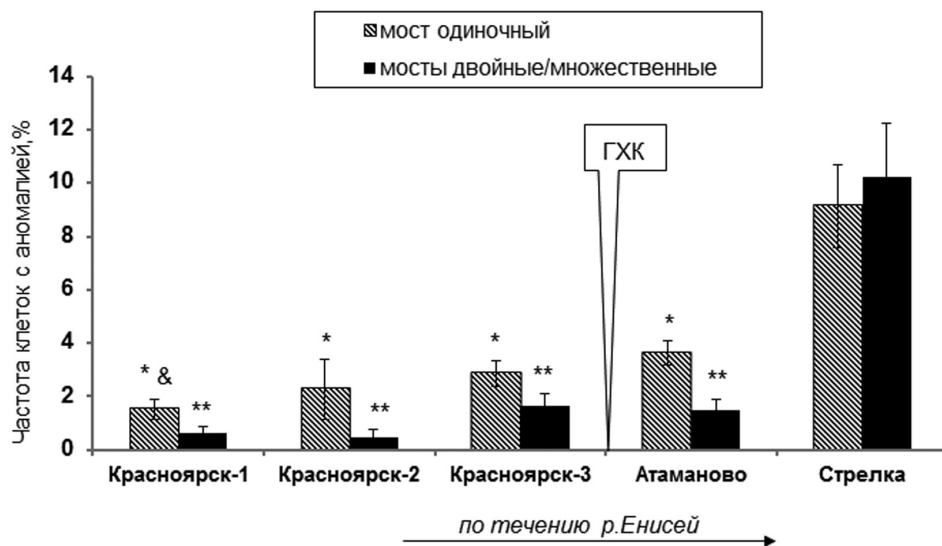


Рис. 4. Частота встречаемости клеток с мостами в анафазных клетках апикальной корневой меристемы *E. canadensis* по течению реки Енисей (% , среднее \pm SE). Условные обозначения: *, ** — значения достоверно отличаются от пробы из района Стрелка ($p < 0,005$); & — значения достоверно отличаются от пробы из района Атаманово ($p < 0,005$)

Fig. 4. The frequency of the occurrence of anaphase cells with bridges in apical root meristem of *E. canadensis* downstream of the Yenisei River (% , mean \pm SE). Notations: *, ** — the values significantly different from the sample of site Strelka ($p < 0.005$), & — the values significantly different from the sample of site Atamanovo ($p < 0.005$), according to Student's t-test

на клетку [9]. В работах других исследователей также зарегистрировано увеличение частоты встречаемости клеток с мостами, особенно двойными и множественными, в районах с радиоактивным загрязнением [13, 23].

К редким типам aberrаций нерепарируемого типа, связанных с повреждением структуры хромосом, относят агглютинацию и фрагментацию. Частота встречаемости клеток с агглютинацией хромосом на стадии метафазы была в среднем для элодеи из района Атаманово (вблизи сбросов ГХК) в 3–15 раз выше, чем в образцах из других районов, причем на долю этого типа aberrаций приходилось до 40 % аномальных клеток. Агглютинация хромосом может происходить из-за деградации или деполимеризации ДНК хромосом, а также вследствие конденсации ДНК и образования субхроматидных связей между хромосомами [17, 27, 28, 33]. В результате агглютинации расхождения хромосом не происходит и клетки обычно гибнут [28, 34]. Агглютинация также наблюдалась в клетках лука под действием различных химических веществ: ионов меди и кобальта в высоких концентрациях [20, 34], бензо(а)-пирена [17] и жидких стоков химзавода [14]. В исследованных нами пробах элодеи из района Атаманово наряду с агглютинацией была отмечена повышенная частота клеток с фрагментацией хромосом (до 2 % клеток на стадии метафазы). Фрагментация хромосом является признаком разрушения их структуры, связанного с лизированием ферментами молекул ДНК, и служит показателем нестабильности генома [32]. Фрагментация хромосом обнаружена также у сосны обыкновен-

ной, березы повислой и дуба черешчатого в 30-километровой зоне Чернобыльской АЭС и в километровой зоне Нововоронежской АЭС [3, 4].

В пробах элодеи из района с повышенной активностью ^{137}Cs в донных отложениях (Стрелка) достоверно чаще, чем в других районах, встречались клетки с множественными аномалиями на стадии анафазы. Половину всех множественных аномалий составляли сочетание мостов с дезориентированными хромосомами (либо фрагментами хромосом), 13 % — сочетание агглютинации с другими аномалиями, 11 % — асимметричный митоз с мостами, 7 % — многополюсный митоз с мостами и другие типы множественных аномалий. Повышенную частоту клеток с множественными aberrациями отмечали также в корнях тростника обыкновенного из водоемов Чернобыльской зоны отчуждения, характеризующихся наибольшей мощностью дозы облучения [13].

Многополюсные и асимметричные митозы, напротив, встречались чаще в корнях элодеи из центра г. Красноярска (Красноярск-2) по сравнению с районами радиационного загрязнения, составляя до 30 % всех аномалий в анафазе митоза. Этот тип аномалий связан с нарушениями веретена деления, например в результате связывания тяжелых металлов с белком тубулином [34]. Многополюсные митозы с большой частотой возникают при опухолевом росте клеток, а также легко индуцируются разнообразными химическими и физическими воздействиями [1, 18, 30]. Неравномерное и многополюсное расхождение хромосом может привести к неправильному распределению генетического материала между дочерними ядрами, в результате

которого образуются анеуплоидные клетки и нарастает гетерогенность клеточных популяций [7].

Полученные данные по цитогенетическим нарушениям в клетках элодеи канадской согласуются с выводами других авторов о различии в реакциях живой клетки на действие факторов нерадиационной и радиационной природы. Считается, что воздействие радиации приводит к возрастанию частоты хромосомных aberrаций в клетке (делеции, транслокации), а действие химических мутагенов чаще всего приводит к генным мутациям или повреждению митотического веретена [13, 22, 23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, была отмечена тенденция к изменению спектра и частоты хромосомных aberrаций в корневой меристеме элодеи по течению реки Енисей. В районах с повышенной активностью радионуклидов в донных отложениях (Атаманово, Стрелка) преобладали аномалии, связанные с нарушением структуры хромосом в клетках элодеи, и увеличивалась частота aberrаций нерепарируемого типа (агломинация, фрагментация хромосом), что свидетельствует о высокой генотоксичности среды в зоне влияния радиоактивных сбросов ГХК. В районе, характеризующемся наиболее высокой активностью ^{137}Cs в донных отложениях (Стрелка), отмечены множественные нарушения в анаелофазных клетках элодеи и возрастание частоты встречаемости клеток с мостами, что, по-видимому, связано с усилением репарационных процессов в клетке. В районах г. Красноярска, где регистрировали только химическое загрязнение донных отложений, в спектре аномалий элодеи преобладали нарушения веретена деления (дезорientированные хромосомы — в метафазе и асимметричный и многополюсный митоз — в анаелофазе).

Хотя нам не удалось однозначно идентифицировать aberrации хромосомного типа (двойные мосты и фрагменты), была отмечена тенденция к увеличению частоты «тяжелых» патологий митоза (нерепарируемых) и множественных нарушений в клетках элодеи с участков реки Енисей, находящихся в зоне радиационного влияния ГХК. Отсутствие достоверных различий по частоте встречаемости кольцевых хромосом (которые считаются маркерами радиационного воздействия) в пробах элодеи из зоны влияния ГХК и районов г. Красноярска, возможно, связано с относительно низким уровнем дозовой нагрузки облучения клеток элодеи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.А. Удалову и Н.С. Дикареву (ВНИИ радиологии и агроэкологии, г. Обнинск), Н.Г. Платову (Институт медико-биологических проблем РАН, г. Москва), О.В. Квитко (Институт леса

им. В.Н.Сукачева СО РАН, г. Красноярск) за ценные консультации по цитогенетике. Цитогенетические исследования проб элодеи, отобранной в районе радиоактивной аномалии вблизи с. Стрелка, выполнены при поддержке гранта РФ № 14-14-00076. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиева И.Б., Воробьев И.А. Поведение клеток и распределение центриолей при многополюсном митозе, индуцированном действием нокодазола // Цитология. — 1989. — Т. 31. — Вып. 6. — С. 633–637. [Aliyeva IB, Vorobyov IA. Povedeniye kletok i raspredeleniye centriolej pri mnogopoljusnom mitoze, inducirovannom dejstviem nokodazola. *Cytologia*. 1989;31(6):633-637. (In Russ.)].
2. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. — М.: Медицина, 1972. [Alov IA. Cytophysiology and pathology of a mitosis. Moscow: Medicine; 1972. (In Russ.)].
3. Артюхов В.Г., Калаев В.Н. Цитогенетический мониторинг состояния окружающей среды на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. — С. 2006. — Т. 46. — Вып. 2. — С. 208–215. [Artyukhov VG, Kalaev VN. The Cytogenetic Monitoring of the Environmental Conditions on the Territories Exposed by the Radioactive Contamination as a Result of Chernobyl Nuclear Power Station Accident. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2006; 46(2):208-215 (In Russ.)].
4. Буторина А.К., Калаев С.С., Карпова В.Н. Цитологические нарушения в соматических клетках человека и березы повислой в районах г. Воронежа с различной интенсивностью антропогенного загрязнения // Экология. — 2002. — Т. 33. — Вып. 6. — С. 438–441. [Butorina AK, Kalaev VN, Karpova SS. Cytogenetic damage of Human somatic cells and weeping Birch cells in Voronezh districts with different levels of anthropogenic pollution. *Russian Journal of Ecology*. 2002;33(6):413-416. (In Russ.)]
5. Болсуновский А.Я., Муратова Е.Н., Суковатый А.Г., и др. Радиоэкологический мониторинг реки Енисей и цитогенетические характеристики водного растения *Eloдея канадская* // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. — Т. 47. — Вып. 1. — С. 63–73. [Bolsunovsky AY, Muratova EN, Sukovaty AG, et al. Radioecologicheskyy monitoring reki Enisjej i citogeneticheskije kharakteristiki vodnogo rastenija *Eloдея canadensis*. *Radiacionnaja biologija. Radioekologiya*. 2007; 47(1):63-73 (In Russ.)].
6. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1998. — 459 с. [Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. Moscow: Praktika; 1998: 459 (In Russ.)]

7. Горячкина О.В., Сизых О.А. Цитогенетические реакции хвойных растений в антропогенно нарушенных районах г. Красноярск и его окрестностей // Хвойные бореальной зоны. — 2012. — Т. 30. — Вып. 1–2. — С. 46–51. [Goryachkina OV, Sizyh OA. Citogeneticheskiye reakcii hvoynyh rastenij v antropogenno narushennyh rajonah g. Krasnojarska i ego okrestnostej. *Hvoynye boreal'noj zony*. 2012;30(1-2): 46-51 (In Russ.)]
8. Зотина Т.А. Фитомасса и видовое разнообразие макрофитной растительности реки Енисей на участке от г. Красноярск до устья р. Ангара // Журнал Сибирского федерального университета. Серия Биология. — 2014. — Т. 7. — Вып. 1. — С. 73–86 [Zotina TA. Phytomass and Specific Diversity of Macrophyte Vegetation in the Middle Reach of the Yenisei River. *J of Siberian Federal University. Biology series*, 2014;7(1):73-86. (In Russ.)]
9. Машкина О.С., Калаев В.Н., Мурая Л.С., Леликова Е.С. Цитогенетические реакции семенного потомства сосны обыкновенной на комбинированное антропогенное загрязнение в районе Новолипецкого металлургического комбината // Экологическая генетика. — 2009. — Т. 7. — Вып. 3. — С. 17–29. [Mashkina OS, Kalayev VN, Muraya LS, Lelikova ES. Cytogenetic response of seed progeny of scots pine to combined anthropogenic pollution in the area of Novolipetsk metallurgical combine. *Ekologicheskaja genetika*. 2009;7(3):17-29 (In Russ.)]
10. Муратова Е.Н., Горячкина О.В., Корнилова М.Г., и др. Цитогенетическое изучение водных растений акватории Енисея в зоне радиационного загрязнения // Известия РАН. Серия биологическая. — 2004. — Вып. 5. — С. 510–517. [Muratova EN, Goryachkina OV, Kornilova MG, et al. Cytogeneticheskoje izuchenije vodnyh rastenij akvatorii Yeniseja v zonzje radiacionnogo zagrjaznjenja. *Izvestija RAN. Series biological*. 2014;5:510-517 (In Russ.)]
11. Севаньяев А.В., Потетня О.И., Михайлова Г.Ф. Частота цитогенетических нарушений в лимфоцитах периферической крови у жителей Орловской области, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях после Чернобыльской аварии // Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра). — 2003. — Вып. 1. — С. 87–95 [Sevankayev AV, Potetnya OI, Mikhaylova GF. Chastota citogeneticheskikh narushenij v limfocitah perifericheskoy krovi u zhitelej Orlovskoj oblasti, prozhivajushhih na zagrjaznennyh radionuklidami territorijah posle Chernobył'skoj аварии. *Radiacija i risk*. 2003; S1:87-95. (In Russ.)]
12. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма. Учебное пособие / Калаев В.Н., Карпова С.С. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2004. — 79 с. [Citogenetichjesky monitoring: metody ocenki zagrjaznenija okružhajuchej sredy i sostojanija geneticheskogo apparata organizma. Uchebnoe posobie. Kalayev V.N., Karpova S.C. Voronezh: Izdatjel'stvo VGU; 2004:79. (In Russ.)]
13. Шевцова Н.Л., Гудков Д.И. Цитогенетические нарушения у тростника обыкновенного *Phragmites australis* в водоемах Чернобыльской зоны отчуждения // Гидробиологический журнал. — 2012. — Т. 48. — Вып. 6. — С. 99–113 [Shevtsova NL, Gudkov DI. Cytogeneticheskiye narushenija u trostnika obyknovjennogo *Phragmites australis* v vodoyomah Chernobył'skoj zony otchuzhdenija. *Hidrobiologicheskij zhurnal*. 2012;48(6):99-113 (In Russ.)]
14. Abdel Migit HMA, Azab YA, Ibrahim WM. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 2007;66(1):57-64. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.10.011.
15. Al-Sabti K, Kureles B. Chromosomal aberration in onion (*Allium cepa*) induced by water chlorination by-products. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1985;34(1):80-88. doi: 10.1007/bf01609706.
16. Bolsunovsky A, Muratova E, Sukovaty A, Kornilova M. The effect of radionuclide and heavy metal contamination of the Yenisei River on cytogenetics of aquatic plant *Elo-dea canadensis*. *Radioprotection*. 2009;44(5):83-88. doi: 10.1051/radiopro/20095021.
17. Cabaravdic M. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of cells to benzo(a)pyrene. *Med Arh*. 2010;64(4):215-218.
18. Dudas M, Hlinka D, Jesenska R, Kalatova B. Tripolar mitosis in human cells and embryos: Occurrence, pathophysiology and medical implications. *Acta Histochemica*. 2015;117(1):111-125.
19. Evseeva TI, Geras'kin SA, Shuktomova II. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. *J Environ Radioact*. 2003;68(3):235-248. doi: 10.1016/s0265-931x(03)00054-7.
20. Fiskesjo G. The *Allium*-test — an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*. 1988;197(2):243-260. doi: 10.1016/0027-5107(88)90096-6.
21. Geras'kin S, Evseeva T, Oudalova A. Plants as a tool for the environmental health assessment. In: Encyclopedia of Environmental Health. *Nriagu J*. 2011a:571-579.
22. Geras'kin S, Oudalova A, Michalik B, et al. Genotoxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas Poland by means of *Allium*-test. *Chemosphere*. 2011b;83:1133-1146. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.01.008.
23. Geras'kin SA, Oudalova AA, Dikarev VG, et al. Effects of chronic exposure in populations of *Koeleria gracilis* Pers. from the Semipalatinsk nuclear test site,

- Kazakhstan. *J Environ Radioact.* 2012;104:55-63. doi: 10.1016/j.jenvrad.2011.09.015.
24. Liman R, Akyil D, Eren Y, Konuk M. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both *Ames/Salmonella* and *Allium* test. *Chemosphere.* 2010;80(9):1056-61. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.05.011.
25. MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger T.A. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for fresh-water ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2000;39(1):20-31. doi: 10.1007/s002440010075.
26. Medvedeva MY, Bolsunovsky AY, Zotina TA. Cytogenetic abnormalities in aquatic plant *Elodea canadensis* in anthropogenic contamination zone of Yenisei River. *Contemporary Problems of Ecology.* 2014;7(4):422-432. doi: 10.1134/s1995425514040088.
27. Mert M, Betül B. Cytogenetic effects of *Urginea maritima* L. aqueous extracts on the chromosomes by using *Allium* test method. *Caryologia.* 2008;61(4):342-348. doi: 10.1080/00087114.2008.10589645.
28. Olorunfemi DI, Olorunfemi OP, Agbozu IE. Genotoxicity Assessment of Contaminated Drinking Water Sources in a Rural Community in Edo State of Nigeria. *J of Geoscience and Environment Protection.* 2014;2(2):52-59. doi: 10.4236/gep.2014.22009.
29. Rodrigues AS, Oliveira NG, Gil OM, et al. Use of cytogenetic indicators in radiobiology. *J Radiat Prot Dosim.* 2005;115(1-4):455-460. doi: 10.1093/rpd/nci072.
30. Seth CS, Misra V, Chauhan LKS, Singh RR. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008;71(3):711-716. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.02.003.
31. Shevtsova NL, Gudkov DI. Cytogenic effects of long-term radiation on higher aquatic plants within the Chernobyl accident Exclusion Zone. *Radioprotection.* 2009;44(5):937-940. doi:10.1051/radiopro/20095167.
32. Stevens JB, Liu G, Bremer SW, et al. Mitotic cell death by chromosome fragmentation. *Cancer Res.* 2007;67(16):7686-7694. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-0472.
33. Mustafa Y, Suna Arikan E. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia.* 2008;61(1):45-52. doi: 10.1080/00087114.2008.10589608.
34. Yildiz M, Cigerci IH, Konuk M, et al. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and Comet assays. *Chemosphere.* 2009;75(7):934-938. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.023.

TYPES OF CYTOGENETIC ABNORMALITIES IN APICAL ROOT MERISTEM OF *ELODEA CANADENSIS* FROM YENISEI RIVER AREAS WITH DIFFERENT TYPES OF ANTHROPOGENIC POLLUTION

M.Yu. Medvedeva, A.Ya. Bolsunovsky

For citation: *Ecological genetics.* 2016;14(2):57-66

✿ **SUMMARY: Background.** The spectrum of cytogenetic abnormalities in the apical root meristem of *Elodea canadensis* Michx. (elodea) from the Yenisei River was studied depending on the type of anthropogenic pollution. We compared elodea samples from areas with radiation-contaminated sediments (area affected by Rosatom Mining and Chemical Combine, MCC, Zheleznogorsk) and areas with chemical pollution (Krasnoyarsk). **Materials and methods.** The apical root meristem of elodea was fixed in acetic alcohol (96 % ethanol and glacial acetic acid, 3:1) and stained with 1 % aceto-orcein. The cytogenetic analysis of metaphase and ana-telophase elodea cells was carried out with temporal squashed preparations using an Olympus CX31 microscope. **Results.** At metaphase stage, the predominant types of abnormalities in elodea cells were disoriented chromosomes (up to 9 % of total metaphase cells) and chromosome agglutination (6 %). In the area affected by the MCC an increased content of ring chromosomes in elodea cells was detected, but in terms of frequency of their occurrence no significant differences were revealed between samples from areas with different types of pollution. Among abnormalities at ana-telophase stage, bridges (to 20 % of dividing cells) and disoriented chromosomes (up to 8 %) dominated. The following abnormalities were also detected: multipolar and asymmetrical mitoses, agglutination and cells with multiple chromosome abnormalities. It was shown that in areas with the highest content of ¹³⁷Cs in bottom sediments the frequency of cells with bridges and multiple chromosome abnormalities significantly increased as compared to samples from other areas. **Conclusion.** In the radioactive contamination area of the Yenisei River the spectrum of abnormalities was dominated by chromosome aberrations (bridges, agglutination, chromosome fragmentation) and multiple abnormalities in one and the same cell. In areas with non-radioactive (chemical) contamination of sediments, mitotic spindle irregularities prevailed.

✿ **KEYWORDS:** *Elodea Canadensis*; Yenisei River; genotoxicity; mitotic abnormalities; anthropogenic contamination of sediments.

✿ Информация об авторах

Марина Юрьевна Медведова — канд. биол. наук, младший научный сотрудник, лаб. радиоэкологии. ФГБУН «Институт биофизики» СО РАН. E-mail: medvedeva_m79@mail.ru.

Александр Яковлевич Болсуновский — д-р биол. наук, зав. лабораторией радиоэкологии. ФГБУН «Институт биофизики» СО РАН. E-mail: radecol@ibp.ru.

✿ Information about the authors

Marina Yu. Medvedeva — Junior Researcher (Ph.D), Laboratory of radioecology. Institute of Biophysics SB RAS. E-mail: medvedeva_m79@mail.ru.

Alexander Ya. Bolsunovsky — Head of laboratory (Sc.D), Laboratory of radioecology. Institute of Biophysics SB RAS. E-mail: radecol@ibp.ru.