

© О. С. Машкина, В. Н. Калаев,
Л. С. Мурая, Е. С. Леликова

Воронежский государственный
университет

✿ Проведена сравнительная оценка всхожести семян и цитогенетических показателей семенного потомства сосны обыкновенной в экологически чистом и загрязненном (Новолипецкий металлургический комбинат) районах. У потомства деревьев сосны, произрастающих в загрязненном районе, происходит существенное изменение цитогенетических показателей по сравнению с контролем, что связано с интегральными эффектами воздействия загрязнителей. Среди проростков выявлены «мутабильные» и «слабомутабильные» формы. Обсуждаются вопросы адаптации семенного потомства деревьев сосны обыкновенной к стрессовым воздействиям на клеточном и субклеточном уровнях.

✿ **Ключевые слова:** сосна обыкновенная; митоз; митотическая активность; патология митоза; ядрышковые характеристики; комбинированное загрязнение.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ НА КОМБИНИРОВАННОЕ АНТРОПОГЕННОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ В РАЙОНЕ НОВОЛИПЕЦКОГО МЕТАЛЛУРГИЧЕСКОГО КОМБИНАТА

УДК 576.356 : 582.475.4 (470.322)

В современных условиях природная среда подвержена комбинированному техногенному загрязнению. Известно, что в связи с промышленной деятельностью человека синтезируются и попадают в окружающую среду сотни тысяч новых химических соединений с невыясненными токсикологическими характеристиками (Дятлов, 2000).

Города как промышленные центры, характеризующиеся высокой концентрацией производства и населения, оказывают постоянно усиливающееся многостороннее воздействие на окружающую среду и здоровье людей. Учитывая, что экологический каркас любого города образован разными по происхождению, назначению и структуре зелеными насаждениями, перспективной и актуальной является оценка стабильности развития древесных культур, в том числе их цитогенетического гомеостаза как маркера состояния окружающей среды (Дружкина, 2007). Нами была предпринята попытка выявить цитогенетические реакции семенного потомства деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на комбинированное загрязнение в условиях крупного промышленного центра. Выбор объекта исследования был продиктован тем, что сосна обыкновенная является одним из основных видов-лесообразователей на территории России и имеет важное природоохранное значение. Установление вышеуказанных закономерностей позволит разработать методы использования данного растения для целей биомониторинга загрязнения окружающей среды, выявить возможные пути адаптации к стрессовым факторам на клеточном и субклеточном уровнях, на основании чего отбирать устойчивые особи для целей лесовосстановления на антропогенно загрязненных территориях.

В настоящее время в литературе приводится большое количество данных об использовании древесных растений в качестве тест-объектов: представителей родов лиственных — *Populus*, *Quercus*, *Betula*, *Acer* и других; хвойных — *Pinus*, *Larix*, *Picea* и *Abies* (Буторина и др., 2000, 2002; Калаев, Вуторина, 2006; Дружкина, 2007; Калашник, 2008; Квитко, 2009 и др.).

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) является перспективным видом для контроля загрязнения окружающей среды. Хвойные породы обладают исключительно высокой радиочувствительностью, примерно такой же, какая свойственна человеку. ЛД₁₀₀ у видов рода *Pinus* колеблется в пределах 6–20 Гр (Кальченко, 1989). Наряду с высокой чувствительностью к загрязняющим веществам, сосна удобна для анализа цитологических, морфологических и биохимических критериев (Эрна, Раук, 1986). Еще одно преимущество хвойных растений — длительность генеративного цикла. Если у большинства покрытосеменных видов репродуктивный цикл длится несколько месяцев, то у сосны с момента закладки генеративных органов до созревания семян проходит более двух лет. В условиях хронического действия антропогенных поллютантов столь длительный цикл развития семян даже при низких дозах (концентрациях) приводит к накоплению достаточного для индикации внешнего воздействия количества повреждений ДНК (Гераськин, 2000).

Ранее проводились исследования цитогенетических характеристик семенного потомства сосны обыкновенной на экологически «чистых» территориях (Буторина и др., 2001; Дорошев, 2004; Черкашина, 2007), в районе крупных ядерных объектов (Гераськин и др., 2000; Сенькевич, 2007), на территориях,

Поступила в редакцию 30.04.2009
Принята к публикации 08.07.2009

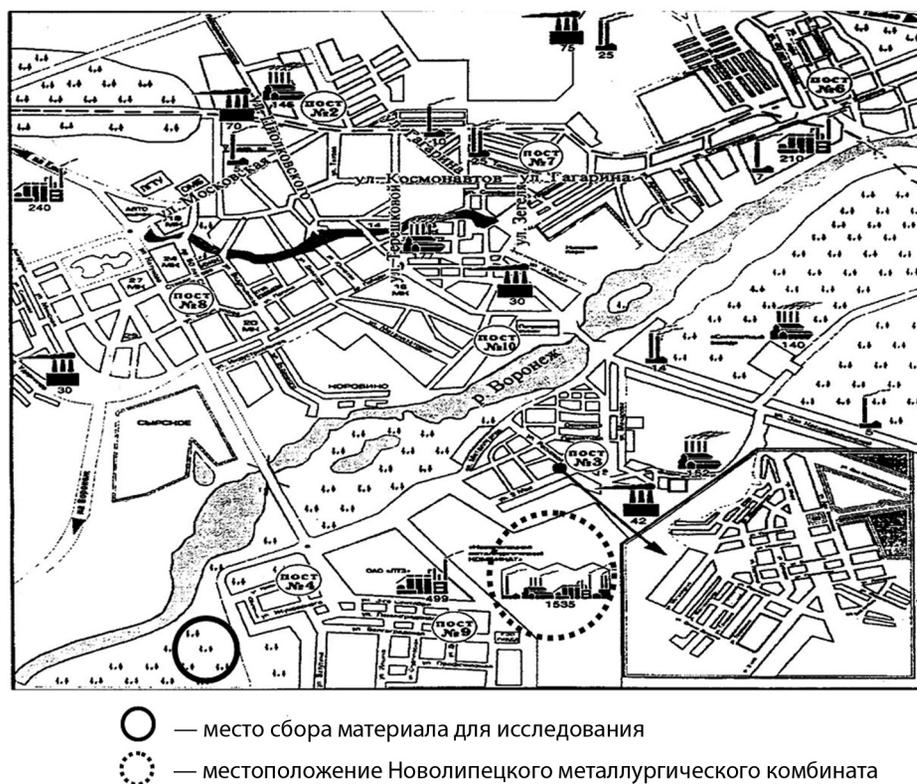


Рис. 1. Место сбора семенного материала сосны обыкновенной на территории города Липецка

подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС (Butorina et al., 2000; Миронов, 2002), в условиях промышленного загрязнения (Шафикова, Калашник, 2000; Буторина и др., 2005; Калашник, 2008), под влиянием выхлопных газов автотранспорта (Машкина и др., 2008), показавшие разнонаправленные тенденции в изменении митотической активности, ядрышковых характеристик, патологий митоза. Исследования же в условиях комбинированного воздействия промышленных поллютантов различной этиологии и выхлопных газов автотранспорта ранее не проводились. На территории Липецкой области цитогенетические исследования сосны обыкновенной проводятся впервые.

ОБЪЕКТ И МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования служили деревья сосны обыкновенной из: 1) насаждений Усманского бора, село Ступино (территория Воронежского биосферного государственного заповедника (ВБГЗ)). Участок Усманского бора, расположенный в границах ВБГЗ, может рассматриваться по данным цитогенетического анализа как эталон экологически безопасной территории (Буторина и др., 2007); 2) лесозащитного насаждения в районе Новолипецкого металлургического комбината (ОАО «НЛМК», г. Липецк) (рис. 1).

ОАО «НЛМК» — одна из крупнейших в мире металлургических компаний, производящая чугун, слэбы, сталь. В то же время ОАО «НЛМК» вносит существенный вклад в загрязнение окружающей природной среды г. Липецка и области. На долю выбросов комбината приходится 89 % от всех выбросов предприятий области (Доклад ... 2000, 2003). Основными источниками загрязнения атмосферы металлургического производства являются агломерационное, коксохимическое, доменное, сталеплавильное, огнеупорное, прокатное производства, теплосиловое хозяйство. От 1362 стационарных источников выбросов вредных веществ ОАО «НЛМК» в атмосферу поступает 76 загрязняющих веществ. Так, общее количество выбросов в 1999 году составило 343,4 тыс. т, в 2004 г. — 333,5 тыс. т (Доклад ... 2000; Стрельникова, Пешкова, 2006). Основными загрязнителями являются газообразные соединения, такие как оксид углерода (280 тыс. т), диоксид серы (20,2 тыс. т), окислы азота (15,7 тыс. т). Кроме того, комбинат выбрасывает: бенз(а)пирен (0,168 т), фтористые соединения (1,848 т), ксилол (0,165 т), фенол (11,474 т), бензол (80,366 т), этилбензол (0,020 т) и другие (Доклад ... 2000, 2003).

На территории ОАО «НЛМК» расположено ЗАО «Завод холодильников Стинол», имеющее 65 источников выбросов вредных веществ в атмосферу, таких как фреон 11, циклопентан, акрилонитрил, бутилцеллозольв.

Кроме того, в Липецке происходит неуклонный рост количества автотранспорта. Так, в 1999 г. количество автотранспорта составило 107 415 ед., при этом выбросы вредных веществ составили 99,4 тыс. т, или 22 % от общего объема выбросов вредных веществ в атмосферу. Из-за выхлопных газов автотранспорта (составляющими выбросов автотранспорта являются свинец, бенз(а)пирен, оксид углерода, окислы азота, углеводороды, окислы серы, бензол, формальдегид, окислы тяжелых металлов и др.), накладывающихся на выбросы промышленных предприятий, в Липецке наблюдается общее неблагоприятное состояние атмосферы. Многие из выше перечисленных загрязнителей относятся к группе кластогенов, вызывающих различные абберрации хромосом (Дружинин, 2003). Таким образом, исследуемое нами защитное насаждение сосны обыкновенной испытывает интегральный эффект от комплекса стрессорных воздействий, связанных с влиянием различных по природе антропогенных факторов.

Место сбора семян находилось на расстоянии 2 км от ОАО «НЛМК».

Цитогенетические исследования проводились нами в течение двух лет (2006, 2007 гг.). Материалом для исследований служили семена сосны обыкновенной от свободного опыления. Сбор семян осуществляли в 2005 и 2006 гг. в октябре-ноябре месяце. Для каждой контрольной и опытной территории семена заготавливали с 4–5 фенотипически нормальных деревьев. Собранные семена (в равных количествах от каждого дерева) смешивали и помещали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу; проращивание их производили при комнатной температуре. Определение лабораторной всхожести семян проводили на 14-й день проращивания. Материалом для цитогенетического анализа служили проростки семян, достигшие длины 5–15 мм. Проростки из контрольного и опытного вариантов фиксировали в 9 часов утра по зимнему времени (в это время в корневой меристеме проростков семян отмечается пик митотической активности (Дорошев, 2004)) в спиртово-уксусной смеси (3 части 96 % этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты). Препараты для цитологического анализа, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по описанной ранее методике (Буторина и др., 2000). Просмотр препаратов осуществлялся на микроскопе LABOVAL-4 (Carl Zeiss, Jena) при увеличении $40 \times 1,5 \times 10$. Для каждого варианта просматривали не менее 9–10 корешков проростков. Микрофотосъемку проводили с использованием видеоокуляра DCM300 (Shangrao TeleView Optical Instruments Co., Ltd.).

На препаратах определяли следующие цитогенетические характеристики.

1. Митотическую активность (**МА**) меристематической ткани определяли по митотическому индексу (**МИ**), как показателю интенсивности ростовых процессов (Ченцов, 2004). Митотическую активность рассчи-

тывали как процентное отношение числа делящихся клеток в митозе к общему числу подсчитанных клеток. Уровень митотической активности вычисляли с учетом и без учета клеток на стадии профазы митоза. Поскольку в профазе возможна задержка деления, то это может существенно повлиять на конечный результат.

2. Процентное соотношение количества клеток по стадиям митоза. Данный критерий имеет большое значение, поскольку ряд неблагоприятных факторов среды может вызывать задержку деления в различных фазах митоза вследствие повреждения хромосом или митотического веретена (Алов, 1965). Учет числа клеток на каждой стадии митоза необходим для определения их продолжительности и регулярности прохождения клеточного цикла через точки проверки (check point).
3. Частоту и спектр (типы) патологий митоза (**ПМ**) учитывали в метафазе, анафазе и телофазе митоза клеток меристемы корешков проростков. В связи с тем, что на стадии профазы трудно уловить какие-либо отклонения в хромосомном аппарате, наиболее объективная информация о патологиях митоза получается, если не учитывать эту стадию. Частота патологий митоза вычислялась как отношение числа клеток с патологиями в мета-, ана-, телофазе митоза к общему числу просмотренных делящихся клеток (на тех же стадиях), в %. Спектр патологических митозов представлен как процентное отношение каждого вида патологий к общему числу патологических митозов. Классификацию патологических митозов производили по Алову (1965). Учитывали наличие и частоту встречаемости клеток с микроядрами, поскольку этот показатель может отражать степень ухудшения условий окружающей среды.
4. Подсчитывали число клеток с пядрышками в интерфазных клетках и определяли долю клеток (в %) с тем или иным их количеством. Количество ядрышек подсчитывали в 500–600 интерфазных клетках на каждом препарате.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе Кулаичева (2006). Для сравнения выборок по митотической активности и ядрышковым характеристикам использовали *t*-критерий Стьюдента. Сравнение выборок по патологиям митоза проводили с использованием *X*-критерия рангов Ван-дер-Вардена, так как данный признак не подчиняется нормальному распределению. Проверка нормальности распределения осуществляли с использованием критерия хи-квадрат. Влияние фактора места произрастания определяли с использованием однофакторного непараметрического дисперсионного анализа Крускал–Уоллиса. Кластерный анализ проводили с использованием метрики нормированный Эвклид, стратегия классификации — группового

Таблица

Цитогенетическая характеристика семенного потомства деревьев сосны обыкновенной, произрастающих на экологически безопасной территории (с. Ступино, Усманский бор) и на территории с антропогенной нагрузкой (район ОАО «НЛМК»)

Цитогенетические показатели, %	Год исследования	Усманский бор (контроль)		Район ОАО «НЛМК» (опыт)	
		$\bar{X} \pm S\bar{x}$	min–max	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	min–max
Митотическая активность с учетом профаз	2006	9,5 ± 0,3	8,0–11,1	7,7 ± 0,8*	3,9–11,4
	2007	9,2 ± 0,4	7,4–11,0	7,4 ± 0,5**	4,7–10,7
	2006 + 2007	9,3 ± 0,2	7,4–11,1	7,6 ± 0,5**	3,9–11,4
Митотическая активность без учета профаз	2006	6,8 ± 0,3	5,2–8,1	6,2 ± 0,7	3,3–10,6
	2007	6,8 ± 0,3	5,4–8,7	5,9 ± 0,5	3,9–8,6
	2006 + 2007	6,8 ± 0,2	5,2–8,7	6,1 ± 0,4	3,3–10,6
Доля клеток на стадии профазы митоза	2006	27,3 ± 1,5	21,3–39,0	20,9 ± 2,6***	4,0–41,0
	2007	24,5 ± 1,9	11,8–26,3	18,6 ± 1,4***	11,8–26,3
	2006 + 2007	25,9 ± 1,2	16,0–39,0	19,9 ± 1,6***	7,0–41,0
Доля клеток на стадии метафазы митоза	2006	28,3 ± 1,8	20,9–39,1	44,5 ± 2,5***	33,3–63,4
	2007	28,3 ± 0,8	23,6–33,3	43,4 ± 1,6***	35,9–50,0
	2006 + 2007	28,3 ± 0,9	20,9–39,1	44,0 ± 1,5	33,3–63,4
Доля клеток на стадии анафазы + телофазы митоза	2006	44,5 ± 2,2	33,1–52,7	34,6 ± 3,2***	19,9–50,0
	2007	47,3 ± 2,1	37,7–60,6	38,0 ± 2,7***	23,7–45,9
	2006 + 2007	45,8 ± 1,5	33,1–60,6	36,1 ± 2,1***	19,9–50,0
Уровень патологий митоза без учета профаз	2006	1,1 ± 0,3	0,0–2,5	11,8 ± 2,5**	0,0–28,0
	2007	0,8 ± 0,3	0,0–2,9	8,9 ± 3,1**	0,0–28,6
	2006 + 2007	0,9 ± 0,2	0,0–2,9	10,5 ± 1,9**	0,0–28,6
Число клеток с микроядрами	2006	0,01 ± 0,01	0,0–0,09	0,9 ± 0,2**	0,0–2,6
	2007	0	0	0,5 ± 0,1	0,0–1,2
	2006 + 2007	0,004 ± 0,004	0,0–0,09	0,7 ± 0,1***	0,0–2,6

* — различия с контролем достоверны (P < 0,05);
 ** — различия с контролем достоверны (P < 0,01);
 *** — различия с контролем достоверны (P < 0,001).

соседа. В матрицу данных вносили значения следующих цитогенетических показателей каждого из проростков с данной опытной территории: % клеток с нарушениями митоза, % клеток с микроядрами. Достоверность разбивания на классы определяли с помощью дискриминантного анализа на основании критерия Махаланобиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контроле (с. Ступино) всхожесть семян была высокой и в среднем по результатам двух лет исследований составила 90,3 %. Всхожесть семян в опытном варианте (район ОАО «НЛМК») была низкой (в 2006 году — 32 %). Семена начинали прорастать только на 7–10-й день (в контроле — на 4–5-й день), причем большинство из них останавливались в развитии, не успев достичь необходимого для фиксации размера — 5–15 мм. В 2007 году всхожесть семян была еще ниже и составила 18 %.

Результаты изучения цитогенетических показателей в корневой меристеме проростков семян деревьев сосны обыкновенной, произрастающих на экологически «чистой» территории и в условиях антропогенного загрязнения, представлены в таблице.

Митотическая активность определяет интенсивность роста. Помимо генетической обусловленности этого показателя, на его проявление могут оказывать значительное влияние и факторы внешней среды. Например, малые дозы радиации и химические мутагены в некоторых случаях стимулируют митотическую активность (Нариманов, Корыстов, 1997), а в некоторых — ингибируют (Митрофанов, 1969). При этом ингибирование митотического индекса происходит при высоких уровнях стрессовых воздействий (Крышев и др., 1990). Поскольку МИ в определенное время суток у конкретного вида — достаточно устойчивый показатель, его изменение может отражать мутагенное действие на исследуемые объекты факторов среды (Буторина и др., 2005).

Показатели митотического индекса в семенном потомстве деревьев сосны из с. Ступино (контроль) были высокими и соответствовали значениям и пределам их колебаний, выявленным для сосны обыкновенной в средней полосе России в норме (Буторина и др., 2001; Дорошев, 2004; Сенькевич, 2007; Черкашина, 2007). Среднее значение МИ в контрольном варианте составило $9,3 \pm 0,2\%$ (с учетом профаз) и $6,8 \pm 0,2\%$ (без учета профаз), при их варьировании соответственно $7,4-11,1\%$ и $5,2-8,7\%$.

Не выявлено различий по митотической активности между контрольным и опытным вариантами без учета профазных клеток. Значения МИ в опытном варианте были также достаточно высокими ($6,1 \pm 0,4\%$), хотя имели более широкие пределы варьирования ($3,3-10,6\%$ против $5,2-8,7\%$ в контроле). Снижение митотического индекса на опытной территории (по сравнению с контролем) отмечено для значений МИ с учетом профаз, что связано с существенным уменьшением в образцах проростков семян на опытной территории доли клеток на стадии профазы (таблица).

При сравнении частоты встречаемости клеток, находящихся на различных стадиях митоза, выявлено, что в условиях стресса (на опытной территории) происходит снижение доли клеток на стадии профазы и рост доли клеток на стадии метафазы и анафазы-телофазы митоза по сравнению с контролем. Указанные эффекты связывают с изменением времени формирования веретена деления и блокированием процессов расхождения хромосом к полюсам и цитокинеза (повреждение веретена деления и затруднение процессов прохождения цитотомии) (Казанцева, 1981). Аналогичные явления были выявлены у семенного потомства березы повислой и дуба черешчатого на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС (Артюхов, Калаев, 2006; Artyukhov, Kalaev, 2006). Изменение времени прохождения клетками профазы митоза может быть связано с активацией системы checkpoint (проверки целостности генетического материала), действием механизмов checkpoint-репарации. Известно, что продукты checkpoint-генов сканируют целостность ДНК и способствуют задержке клеточного цикла в случае обнаружения повреждения. К критическим стадиям клеточного цикла (в которых происходит его временная остановка) относят переход клетки от G1 к S-стадии, от G2 к митозу и от метафазы к анафазе (точка проверки целостности генетического материала — mid-anaphase-checkpoint) (Епифанова, 2003; Омельяничук и др., 2004). Например, в точке контроля M-A (метафаза-анафаза — переход) осуществляется проверка правильности сборки веретена и прикрепления хромосом к нему, состояние кинетохоров, что обеспечивает правильную сегрегацию хромосом. При обнаружении слабых дефектов («ошибок») включается система ликвидации повреждений ДНК и восстановления ее исходной структуры. Если же

повреждения ДНК значительны и их исправление не происходит, клетка либо самоуничтожается с помощью процесса апоптоза, либо вступает далее в aberrantное деление. Поэтому «точки контроля» клеточного цикла представляют собой механизм, который предохраняет делящиеся клетки от летального митоза. Это дает нам основание рассматривать изменение времени прохождения клетками стадии профазы или анафазы-телофазы митоза как механизм адаптации к стрессовым факторам среды и поддержания гомеостаза клеточной популяции у проростков семян сосны обыкновенной, произрастающей в экологически неблагоприятных условиях.

Цитогенетическим показателем, отражающим степень повреждения ДНК, является уровень патологий митоза. Данные по изучению частоты патологий митоза (ПМ) в потомстве деревьев сосны из контрольного и опытного вариантов представлены в таблице. 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 (Алов, 1965; Казанцева, 1981). Ранее было выявлено (Дорошев, 2004; Сенькевич, 2007), что наиболее чувствительными к антропогенному загрязнению цитогенетическими показателями у проростков семян сосны обыкновенной, объективно отражающими состояние их генетического аппарата, являются уровень и спектр ПМ, частота встречаемости клеток с микроядрами и число ядрышек в клетке.

Выявлено достоверное увеличение ($P < 0,01$) частоты нарушений митоза у семенного потомства сосны, произрастающей на территории ОАО «НЛМК», подвергающейся хроническому антропогенному воздействию по сравнению с потомством деревьев из экологически благоприятного места (с. Ступино, Усманский бор). Средняя частота встречаемости патологий митоза (ПМ) за два года исследований составила соответственно $10,5 \pm 1,9\%$ и $0,9 \pm 0,2\%$ ($P < 0,01$), на опытной территории данный показатель существенно превышает пределы нормальных значений уровня спонтанного мутирования в средней полосе России — до 5% (Буторина и др., 2001). Отмечено также значительное расширение границ варьирования доли ПМ в клетках проростков из экологически неблагоприятного района ($0-28,6\%$) по сравнению с контролем, где эти значения составили от 0 до $2,9\%$.

При сравнении частоты ПМ по годам исследований (2006 и 2007 гг.) в пределах каждого района произрастания анализируемых деревьев достоверных различий выявлено не было, хотя в целом в 2007 г. отмечено снижение уровня ПМ в районе ОАО «НЛМК» по сравнению с 2006 г. Однако пределы варьирования частоты ПМ

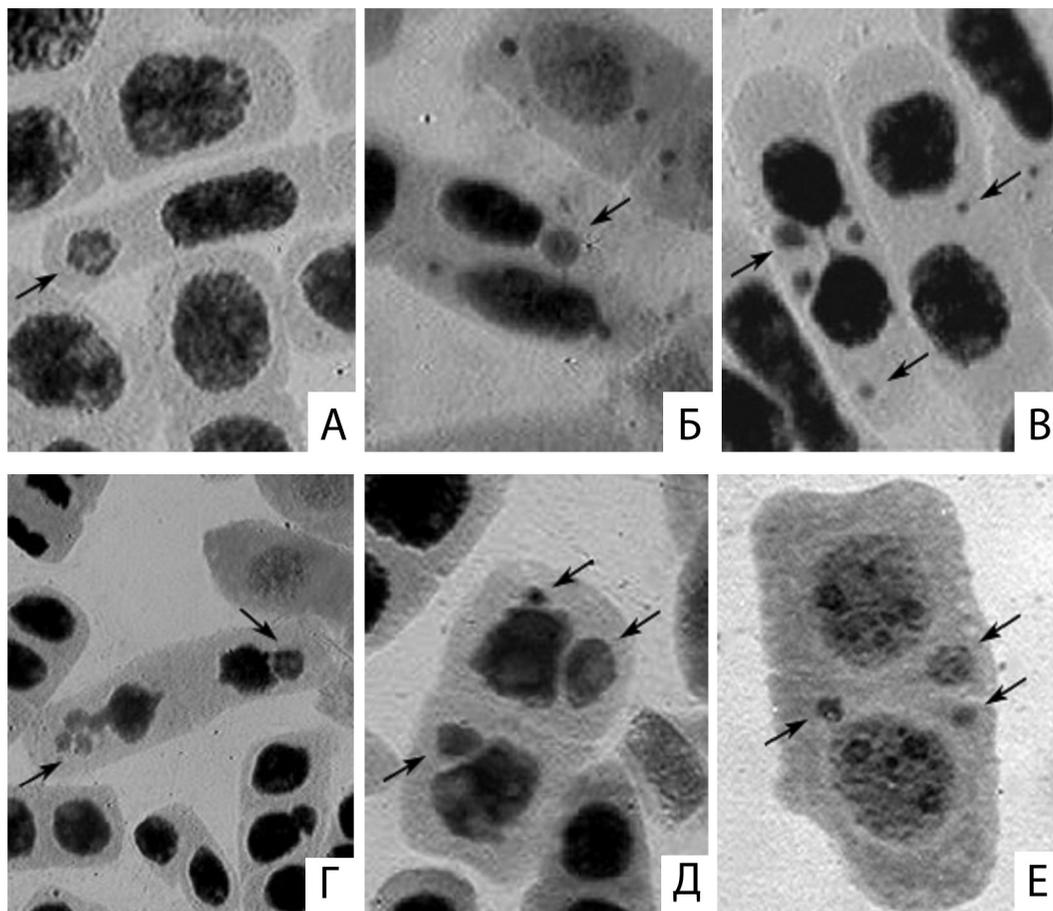


Рис. 2. Микроядра в клетках корневой меристемы проростков семян сосны обыкновенной из насаждения в районе ОАО «НЛМК» (г. Липецк). Увеличение $10 \times 1,5 \times 40$

оставались такими же широкими, как и в 2006 г. (от 0 до 28,6 %).

Данные о частоте встречаемости клеток с микроядрами представлены в таблице. На рис. 2 представлены микрофотографии клеток с микроядрами в корнях проростков семян сосны обыкновенной из насаждения в районе ОАО «НЛМК». В контрольном варианте в клетках корневой меристемы проростков семян клетки с микроядрами были выявлены только в одном проростке (с частотой встречаемости 0,09 %) из 20 изученных. В опытном варианте из 20 проростков у 14 встречались клетки с микроядрами, средняя частота их составила $0,7 \pm 0,1$ % при варибельности данного показателя от 0 до 2,6 %, что свидетельствует о наличии значительного числа нерепарированных повреждений хромосомного материала и ведет к цитогенетической нестабильности клеточных популяций (Ильинских и др., 1992).

Дисперсионный анализ показал, что место произрастания влияет на частоту встречаемости микроядер в клеточных популяциях изученных проростков семян сосны обыкновенной ($P < 0,001$).

Все проанализированные проростки из опытного варианта методами кластерного анализа были разбиты по

частоте ПМ и встречаемости микроядер на две группы — «слабомутабельные» и «мутабельные» (рис. 3). На долю «слабомутабельных» проростков приходится 28,6 % (6 проростков из 21), а на долю «мутабельных» — 71,4 % (15 проростков из 21). Для «мутабельной» группы проростков характерно высокое количество патологий митоза (более 5 %) и клеток с микроядрами. Для «слабомутабельных», соответственно, наоборот (частота ПМ ниже 4 %, отсутствие или очень малое количество (не более 0,3 %) микроядер).

В контроле все проростки по принятым критериям были отнесены в одну группу — «слабомутабельные».

Таким образом, наличие группы «слабомутабельных» проростков в семенном потомстве сосны, произрастающей на территории со значительной стрессовой нагрузкой, свидетельствует о возможности образования в потомстве деревьев устойчивых форм и отбора по данным цитогенетического анализа материнских деревьев, продуцирующих устойчивое к неблагоприятным факторам среды («слабомутабельное») семенное потомство.

Различия между изученными образцами проявились не только по частоте, но и по спектру нарушений митоза (рис. 4). Микрофотографии наиболее часто встречаю-

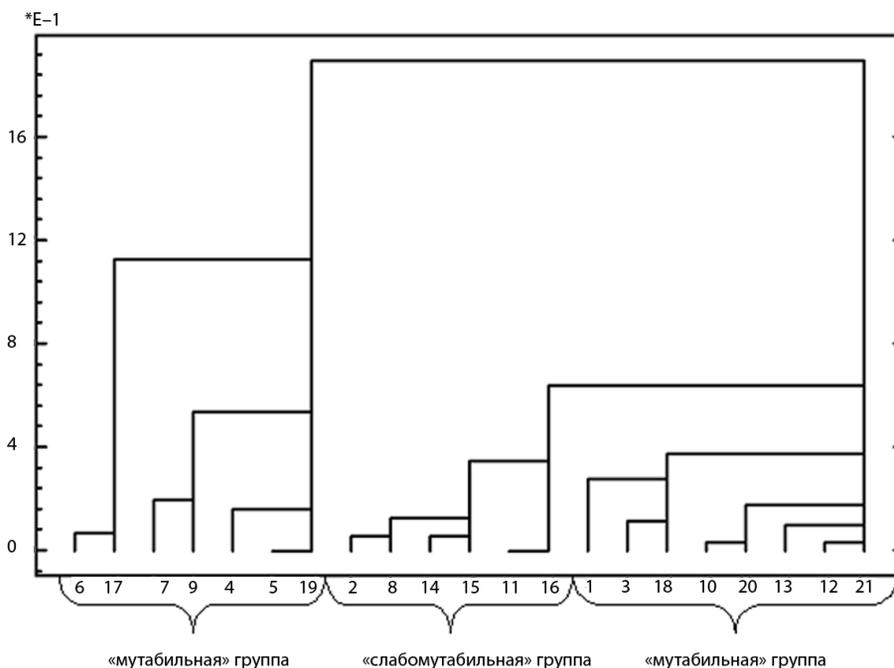


Рис. 3. Дендрограмма кластерных расстояний между проростками семян сосны обыкновенной, произрастающих на опытной территории. По оси ординат — кластерные расстояния, по оси абсцисс — номера проростков

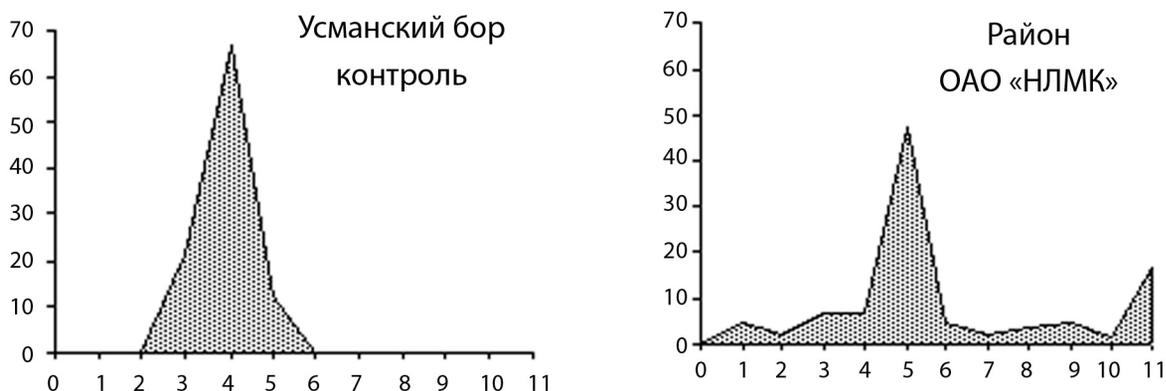


Рис. 4. Спектр патологий митоза (ПМ) в потомстве деревьев сосны обыкновенной из Усманского бора (с. Ступино) и района ОАО «НЛМК». По оси ординат — частота встречаемости клеток с ПМ, %; по оси абсцисс — типы патологий митоза (расшифровка типов патологий митоза представлена в тексте)

щихся нарушений представлены на рис. 5 и 6. Всего нами было выявлено 11 типов патологий митоза, перечень которых представлен ниже: 1) раннее разделение хроматид в профазе и метафазе; 2) фрагменты хромосом в метафазе; 3) отставание хромосом в метакинезе; 4) отставание хромосом в анафазе; 5) мосты в анафазе и телофазе; 6) агглютинация (склеивание) хромосом; 7) к-митоз; 8) рассеивание хромосом; 9) обособление групп хромосом в метафазе и анафазе; многополюсный митоз; 10) микроядра в метафазе, телофазе; 11) сложные нарушения (мост + агглютинация, мост + отставания хромосом, мост + обособление группы хромосом и др.).

В потомстве деревьев сосны обыкновенной, произрастающей в районе ОАО «НЛМК», встречались все 11 типов патологий митоза, тогда как в контроле выявлено только 3 типа.

Спектр ПМ у проростков семян сосны из Усманского бора представлен отставаниями хромосом в метакинезе (21,3 %) и анафазе (66,4 %) митоза, мостами в ана-телофазе (12,3 %). Преобладающим типом нарушений (66,4 %) является отставание хромосом в анафазе, связанное с повреждением хромосом. Такие нарушения могли быть следствием спонтанного мутационного процесса в результате флуктуации погодных факторов или

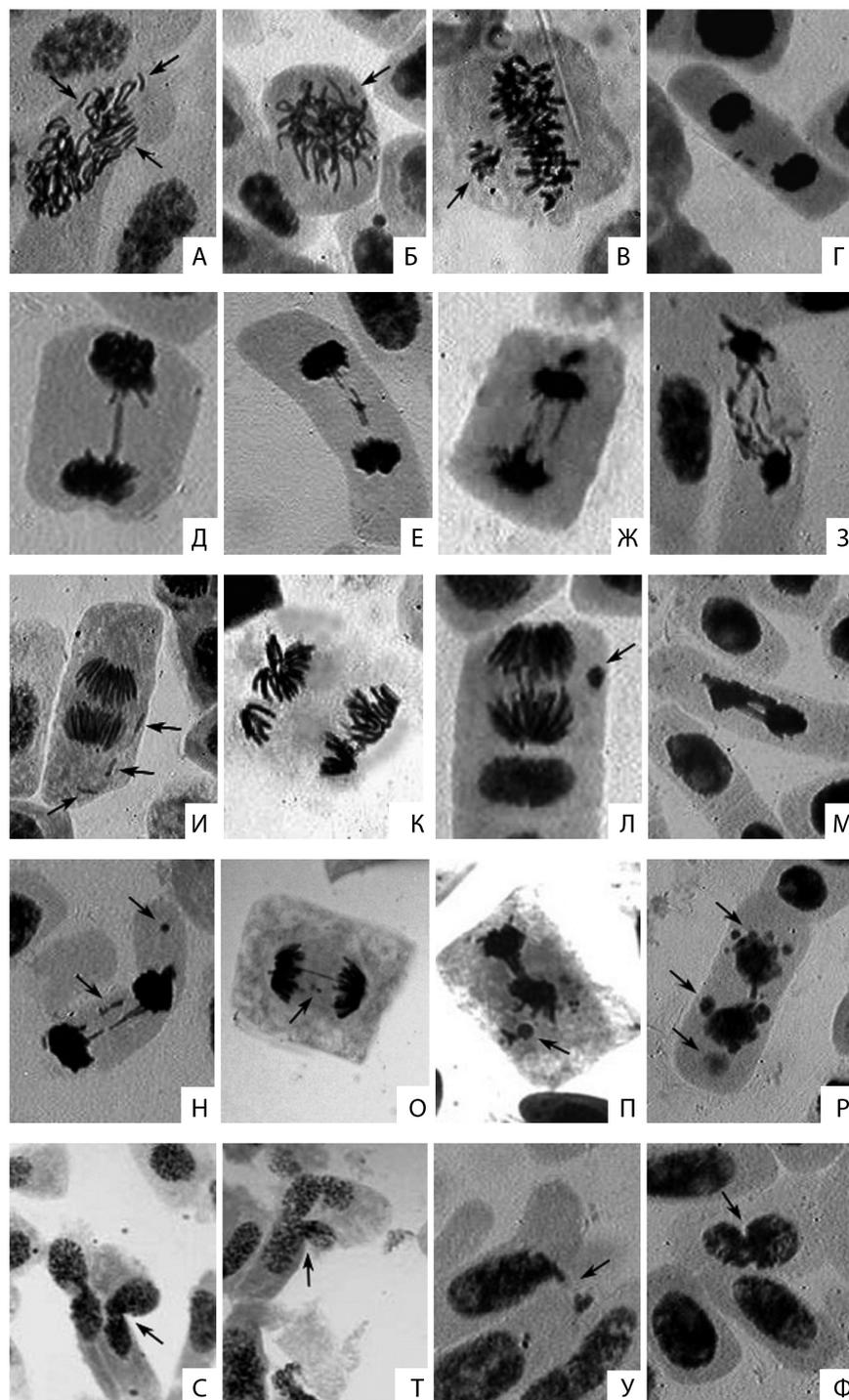


Рис. 5. Типы патологий митоза, встречающиеся у семенного потомства сосны обыкновенной, произрастающей на антропогенно загрязненной территории: А, Б — раннее разделение хроматид и фрагменты хромосом в прометафазе; В — обособление группы хромосом в метафазе; Г — отставание хромосом в анафазе; Д–З — различные типы мостов в анафазе; И — фрагменты хромосом в анафазе; К — обособление группы хромосом в анафазе (многополюсный митоз); Л — микроядро в анафазе; Ж, М–Р — сложные нарушения: мост + разорванный мост + отставание хромосом в анафазе (Ж), мосты + агглютинация хромосом в ана-телофазе (М), разорванный мост + отставший фрагмент хромосомы + микроядро в анафазе (Н), мост с двумя фрагментами в анафазе (О), мост + агглютинация хромосом + микроядра в телофазе (П), мост + множество микроядер в телофазе (Р); С–У — цитомиксис в клетках корневой меристемы; Ф — амитозоподобное деление клетки. Увеличение $10 \times 1,5 \times 40$

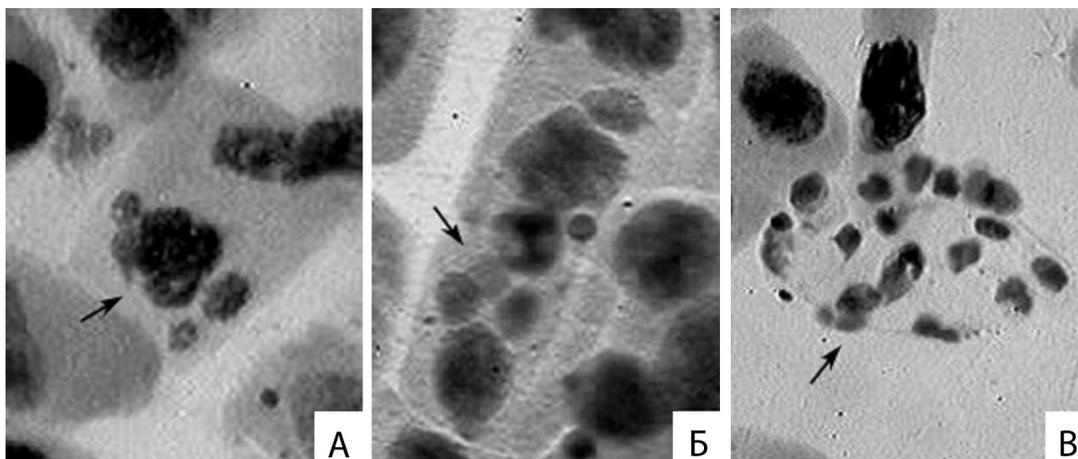


Рис. 6. Апоптоз клеток корневой меристемы проростков сосны обыкновенной, произрастающей в районе ОАО «НЛМК»: 1, 2 — фрагментация ядер; 3 — апоптотические тельца. Увеличение $10 \times 1,5 \times 40$

действия вторичных метаболитов, образующихся в ходе нормальных метаболических процессов в организме, которые в большинстве случаев исправляются репарационными системами клетки.

Спектр ПМ у проростков семян сосны из района ОАО «НЛМК» был представлен как патологиями, связанными с повреждением хромосом (раннее разделение хроматид в профазе, фрагменты хромосом в профазе и метафазе; мосты в анафазе и телофазе; отставание хромосом в метакинезе и анафазе-телофазе, большая часть из которых способна дать начало микроядрам), так и веретенами деления (рассеивание хромосом в метафазе, к-митоз). Обнаруженные нарушения могут привести к неравномерному распределению хромосом между дочерними клетками, потере генетического материала, возникновению анеуплоидии и нарастанию гетерогенности клеточных популяций (Казанцева, 1981).

Преобладающим типом аномалий в клетках проростков семян, собранных в районе ОАО «НЛМК» являются простые и сложные мосты, мосты с фрагментами и микроядрами, разорванные мосты и фрагменты в анафазе и телофазе (5 тип), которые в сумме составили 47,2%. Их преобладание в общем спектре свидетельствует о повышении уровня мутационного процесса (хромосомных перестроек) на антропогенно загрязненной территории. С другой стороны, присутствие мостов, по мнению некоторых авторов (Акопян, 1967; Симаков, 1983) отражает возрастание репарационных способностей объектов и возможную их адаптацию к стрессовому воздействию. Кроме того, существенную долю в общем спектре (16,5%) занимают сложные нарушения, включающие множественные ПМ: мост + агглютинация, мост + отставание хромосом, мост + обособление группы хромосом и др. (рис. 5). Присутствие в анафазе одиночных фрагментов свидетельствует о делециях хроматидного типа, парных — хромосомного. Мосты с фрагментами образуются при асимметричных транслокациях (Бочков

и др., 1972; Муратова, Седельникова, 2004). Среди ПМ отмечены как совместимые, так и несовместимые с жизнью (хромосомные повреждения «жесткого» типа) нарушения митоза, отсутствующие в контроле, — агглютинация хромосом в метафазе и анафазе митоза (4,6%), множественные (сложные) ПМ, цитомиксис, амитоз, микроядра.

Известно, что даже у организмов, существующих в оптимальных условиях, спонтанно возникают клетки, несущие различные хромосомные изменения, хотя частота и спектр таких нарушений обычно невелики. В норме клетки, имеющие несбалансированные хромосомные изменения, элиминируются из клеточной популяции, большая часть нарушений в структуре ДНК репарируется (Захаров, Кларк, 1995). В то же время считают, что у каждого вида система репарации защищает геном до определенного уровня воздействия мутагенного фактора (Шафикова, Калашник, 2000). По достижении критических нагрузок защитные механизмы клетки не могут устранить повреждающее действие мутагенов, что, по видимому, происходит в клетках семенного потомства сосны, испытывающего длительный антропогенный пресинг в районе ОАО «НЛМК».

В качестве ответной реакции на стресс также можно рассматривать появление амитозоподобных и апоптотических клеток и ядер (рис. 5, 6) у проростков клеток сосны обыкновенной из района ОАО «НЛМК». Амитозоподобное деление представляет собой замещение митоза, который становится неэффективным из-за большого количества нарушений, на простой, прямой способ деления. Данное явление ранее описывалось в недифференцированных тканях при сильных стрессовых воздействиях, например при воздействии радиации (Butorina, Evstratov, 1996).

В опытном варианте также отмечено появление группы апоптотических клеток (как проявление работы генетической программы самоликвидации отдельных патологически измененных нежизнеспособных клеток), характеризу-

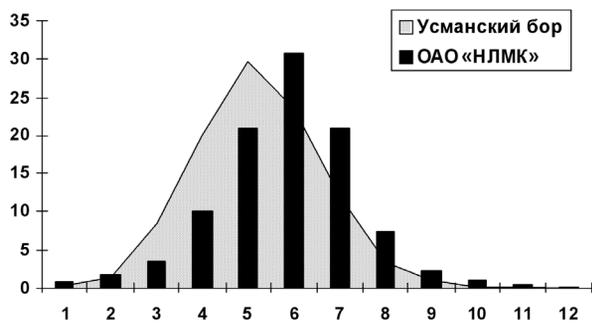


Рис. 7. Распределение ядрышек по их числу в интерфазных клетках корневой меристемы проростков деревьев сосны обыкновенной из Усманского бора (с. Ступино) и района ОАО «НЛМК» за 2006, 2007 гг. По оси ординат — частота встречаемости клеток с n ядрышками, %; по оси абсцисс — число ядрышек в ядре

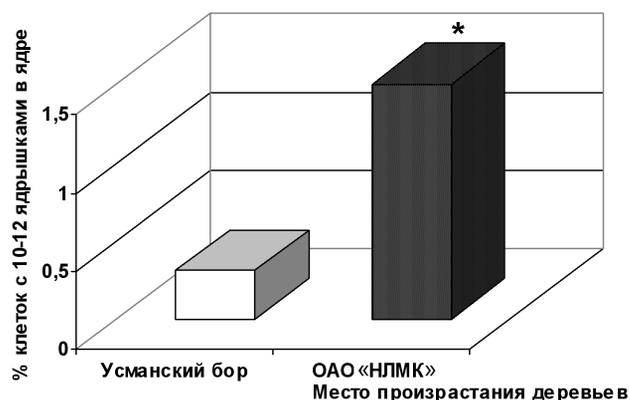


Рис. 8. Частота встречаемости клеток с 10–12 ядрышками в ядре в потомстве деревьев сосны обыкновенной из Усманского бора (с. Ступино) и района ОАО «НЛМК». Обозначения: * — различия с контролем (Усманский бор) достоверны ($P < 0,001$).

ющихся сжатием (пикнозом) хроматина, фрагментацией ядра и самой клетки (формированием апоптотических телец с уплотненным хроматином) (рис. 6).

Известно, что апоптоз — генетически запрограммированная смерть клетки, является естественным биологическим процессом, избавляющим многоклеточный организм от ослабленных, постаревших или поврежденных клеток, запускаемым специфическими внешними или внутриклеточными сигналами. Это могут быть неспецифические факторы, такие как температура, токсические агенты, оксиданты, свободные радикалы, гамма- и УФ-излучение, бактериальные токсины и др. (Уманский, 1996; Манских, 2007 и др.). Апоптозу обычно подвергаются отдельные клетки или небольшие группы клеток из тканевой популяции, без развития воспалительных реакций. Апоптоз происходит быстро (в течение 15–120 минут), что затрудняет его цитологическое выявление. При увеличении дозы соответствующего агента развивается некроз клетки — нерегулируемая смерть большой группы клеток, сопровождающаяся развитием воспалительной реакции. Выраженный характер цитологического проявления апоптоза у отдельных проростков семян из района ОАО «НЛМК» и отсутствие у них некроза, по-видимому, свидетельствует о том, что повреждающее воздействие экзогенных токсических агентов существенно, но еще находится под контролем систем репарации и не достигло пороговых величин для развития митотической катастрофы и некроза.

Согласно шкале, разработанной Захаровым с сотрудниками (2000), позволяющей судить о степени загрязнения района по уровню ПМ, можно сделать вывод о высокой степени загрязнения района ОАО «НЛМК», а также достаточно высокой степени генетического риска для людей в исследованном районе.

Ранее было установлено, что из цитогенетических характеристик наиболее чувствительным критерием мони-

торинга являются ядрышковые показатели клеток, так как изменение активности ядрышкообразующих районов происходит при пороговых воздействиях мутагенов (Архипчук, 1995). 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 (Буторина и др., 2000; Муратова, Седельникова, 2004).

Результаты изучения количества ядрышек в ядрах интерфазных клеток корневой меристемы проростков деревьев из различных мест произрастания представлены на рисунке 7. В контрольном варианте (Усманский бор) преобладают клетки с 4–6 ядрышками (с максимумом — клетки с 5 ядрышками), что является нормой для сосны обыкновенной (Буторина и др., 2001) и свидетельствует о преобладающей активности ядрышковых организаторов двух-трех пар хромосом.

В семенном потомстве деревьев из экологически неблагоприятного района (район ОАО «НЛМК») преобладают клетки с 5–7 ядрышками в клетке (с максимумом клеток с 6 ядрышками). Причем в потомстве деревьев из этого района существенно возрастает число клеток с максимальным количеством ядрышек (10–11 ядрышками в ядре) по сравнению с контролем (рис. 8). Увеличение ЯА в районе ОАО «НЛМК» может быть еще одним показателем того, что деревья испытывают антропогенную нагрузку, а также усиления метаболической активности в стрессовых условиях (активации генов рРНК, рибосом, а также белков) (Калашник и др., 1999) как регуляторного механизма, способствующего усилению белкового метаболизма у деревьев с повышенной частотой патологий митоза.

Таким образом, на основании проведенных исследований мы можем говорить, что в потомстве деревьев сосны, произрастающих в районе ОАО «НЛМК», про-

исходит существенное изменение цитогенетических показателей (возрастают частота и спектр патологий митоза, ядрышковая активность, уровень встречаемости микроядер, происходит ингибирование митотической активности) по сравнению с контролем. Отмечено появление специфических повреждений хромосом (значительное преобладание в общем спектре простых и сложных мостов, появление амитозоподобных и апоптотических клеток и ядер, агглютинация хромосом), отсутствующих в контроле (Усманский бор). Это может быть связано с интегральными эффектами воздействия загрязнителей данного района. Существенно расширяется в этом случае и размах вариабельности изученных цитогенетических показателей. Полученные данные свидетельствуют о высокой генотоксичности загрязнителей среды в районе ОАО «НЛМК», а также о повышении уровня мутабельности и генетической неоднородности семенного потомства. Наличие группы «слабомутабельных» проростков в семенном потомстве сосны, произрастающей на территории со значительной стрессовой нагрузкой, свидетельствует о возможности образования в потомстве деревьев устойчивых форм. Поэтому на основе изучения цитогенетической изменчивости семенного потомства отдельных деревьев можно отобрать генотипы, дающие устойчивое к неблагоприятным факторам среды («слабомутабельное») семенное потомство, представляющее ценность для создания защитных насаждений в зонах с повышенной антропогенной нагрузкой. Наиболее мутабельные формы проростков могут представлять интерес для мутационной селекции. Опираясь на проведенные исследования, можно предположить, что цитогенетическими механизмами адаптации сосны обыкновенной к антропогенному загрязнению в районе ОАО «НЛМК» могут быть усиление метаболических процессов клетки за счет увеличения числа клеток с максимальным количеством ядрышек (10–12) в ядре, снижение митотической активности (что может обеспечить дополнительное время для репарации повреждений хромосомного материала при переходе клеток через точки проверки «checkpoint» клеточного цикла), преобладание в общем спектре нарушений митоза мостов (что может быть цитологическим показателем усиления репаративных процессов в клетках корневой меристемы). Это согласуется с данными других авторов, полученными на сосне обыкновенной (Буторина и др., 2000; Сенькевич, 2007). В числе приспособительных реакций сосны к стрессовым факторам в условиях антропогенного загрязнения, по-видимому, можно рассматривать и появление группы апоптотических клеток как проявления работы генетической программы самоликвидации патологически измененных нежизнеспособных клеток.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке по государственному контракту № 02.512.11.2130 от 25 июня 2007 г., заключенного в рамках Федеральной целевой программы «Клеточные

технологии» и гранту Президента РФ для поддержки молодых российских ученых и ведущих научных школ (грант МК-3481.2007.4).

Литература

1. Аюбян Э. М., 1967. Влияние различных типов ионизирующих излучений на возникновение хромосомных aberrаций у гороха. I. Пострадиационное восстановление // Генетика. Т. 3. № 5. С. 45–51.
2. Алов И. А., 1965. Патология митоза // Вестник АН СССР. № 11. С. 58–66.
3. Артюхов В. Г., Калаев В. Н., 2006. Цитогенетический мониторинг состояния окружающей среды на территориях, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС (на примере поселка Уразово Белгородской области) // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 46. № 2. С. 248–255.
4. Архипчук В. В., 1995. Использование ядрышковых характеристик в биотестировании // Цитология и генетика. Т. 29. № 3. С. 6–12.
5. Бочков Н. П., Демин Ю. С., Лучник Н. В., 1972. Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках // Генетика. Т. 8. № 5. С. 133–142.
6. Буторина А. К., Вострикова Т. В., Бельчинская Л. И., Кондратьева Л. В., 2005. Влияние промышленных сточных вод на цитогенетические показатели березы повислой // Лесное хозяйство. № 6. С. 27–28.
7. Буторина А. К., Калаев В. Н., Вострикова Т. В., Мягкова О. Е., 2000. Цитогенетическая характеристика семенного потомства некоторых видов древесных растений в условиях антропогенного загрязнения г. Воронежа // Цитология. Т. 42. № 2. С. 196–201.
8. Буторина А. К., Калаев В. Н., Карпова С. С., 2002. Особенности протекания митоза и ядрышковые характеристики семенного потомства березы повислой в условиях антропогенного загрязнения // Цитология. Т. 44. № 4. С. 392–399.
9. Буторина А. К., Калаев В. Н., Миронов А. Н. и др., 2001. Цитогенетическая изменчивость в популяциях сосны обыкновенной // Экология. № 3. С. 216–220.
10. Буторина А. К., Черкашина О. Н., Ермолаева О. В., Чернодубов А. И. и др., 2007. Цитогенетический мониторинг аутохтонных лесов Усманского и Хреновского боров // Известия РАН. Серия биологическая. № 4. С. 508–512.
11. Гераськин С. А., Зимина Л. М., Дикарев В. Г., Дикарева Н. С. и др., 2000. Сравнительный анализ методами биоиндикации антропогенного загрязнения района расположения предприятия по переработке и хранению радиоактивных отходов из 30-км зоны ЧАЭС // Экология. № 4. С. 300–303.

12. Доклад о состоянии окружающей природной среды Липецкой области в 1999 г. 2000. Липецк: Типография Липецкого издательства, 184 с.
13. Доклад об использовании природных ресурсов и состоянии окружающей природной среды Липецкой области в 2002 г. 2003. Липецк: Типография Липецкого издательства, 176 с.
14. Дорощев С. А., 2004. Влияние антропогенных стрессоров на изменчивость цитогенетических показателей у сосны обыкновенной: Автореф. канд. дис. Воронеж, 23 с.
15. Дружинин В. Г., 2003. Количественные характеристики частоты хромосомных aberrаций в группе жителей крупного промышленного региона Западной Сибири // Генетика. Т. 39. № 8. С. 1–8.
16. Дружкина Т. А., 2007. Скрининговая оценка экологического состояния городской среды по древесным культурам: Автореф. канд. дис. Астрахань, 25 с.
17. Дятлов С. Е., 2000. Роль и место биотестирования в комплексном мониторинге загрязнения морской среды // Экология моря. Т. 51. С. 83–87.
18. Епифанова О. И., 2003. Лекции о клеточном цикле. М.: КМК, 160 с.
19. Захаров В. М., Кларк Д. М., 1995. Биотест: Интегральная оценка здоровья экосистем и отдельных видов. — М.: Московское отделение Международного фонда «Биотест», 68 с.
20. Захаров В. М., Чубинишвили А. Т., Дмитриев С. Г., Баранов А. С. и др., 2000. Здоровье Среды: практика оценки. — М., Центр экологической политики России; Центр здоровья среды, 320 с.
21. Ильинских Н. Н., Новицкий В. В., Ванчугова Н. Н., Ильинских И. Н., 1992. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Изд-во Том. ун-та, 272 с.
22. Казанцева И. А., 1981. Патология митоза в опухолях человека. — Новосибирск: Наука, 114 с.
23. Калашник Н. А., 2008. Хромосомные нарушения как индикатор оценки степени техногенного воздействия на хвойные насаждения // Экология. № 4. С. 276–286.
24. Калашник Н. А., Шафикова Л. Н., Лихонос Т. А., Сагитова С. Н., 1999. Индикация загрязнения окружающей среды с использованием кариологических методов // Цитология. Т. 41. № 12. С. 1065.
25. Кальченко В. А., Спиринов Д. А., 1989. Генетические эффекты в популяциях сосны обыкновенной, произрастающей в условиях хронического облучения малыми дозами // Генетика. Т. 25. № 6. С. 1059–1069.
26. Квитко О. В., 2009. Цитогенетическая и кариологическая характеристика пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.): Автореф. канд. дис. Красноярск, 19 с.
27. Крышев И. И., Алексахин Р. М., Рябов И. Н., Фесенко С. В. и др., 1990. Радиоактивное загрязнение районов АЭС. М.: Ядерное общество СССР, 150 с.
28. Кулаичев А. П., 2006. Методы и средства комплексного анализа данных. М.: ФОРУМ; ИНФРА, 512 с.
29. Манских В. Н., 2007. Пути гибели клетки и их биологическое значение // Цитология. Т. 49. № 11. С. 909–915.
30. Машкина О. С., Кузнецова Н. Ф., Исаков Ю. Н., 2008. Влияние химических мутагенов на изменчивость семенного потомства разных генотипов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Принципы и способы сохранения биоразнообразия. Йошкар-Ола, Пушино: Мар. гос. ун-т. С. 266–267.
31. Миронов А. Н., 2002. Цитогенетические эффекты от воздействия ионизирующей радиации и импульсных электромагнитных полей на древесные растения: Автореф. канд. дис. М., 24 с.
32. Митрофанов Ю. А., 1969. Радиочувствительность клеток на различных фазах митотического цикла // Успехи современной генетики. М.: Наука, С. 125–160.
33. Муратова Е. Н., Седельникова Т. С., 2004. Геномные и хромосомные мутации у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в экстремальных условиях произрастания // Хвойные бореальные зоны. № 2. С. 128–140.
34. Нариманов А. А., Корыстов Ю. Н., 1997. Стимулирующее действие малых доз ионизирующего излучения на развитие растений // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 37. № 3. С. 312–319.
35. Омельянчук Л. В., Трунова С. А., Лебедева Л. И., Федорова С. А., 2004. Основные события клеточного цикла, их регуляция и организация // Генетика. 2004. Т. 40. № 3. С. 293–310.
36. Сенькевич Е. В., 2007. Цитогенетика сосны обыкновенной и березы повислой в районе Нововоронежской АЭС в связи с вопросами оценки загрязнения окружающей среды: Автореф. канд. дис. Воронеж, 22 с.
37. Симаков Е. А., 1983. О пострадиационном восстановлении цитогенетических повреждений в проростках семян разных форм картофеля // Радиобиология. Т. 23. № 5. С. 703–706.
38. Стрельникова Т. Д., Пешкова Н. В., 2006. Экологические аспекты Липецкого региона (реальности и прогноз). Липецк: ЛИРО, 150 с.
39. Уманский С. Р., 1996. Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы // Молекулярная биология. Т. 30. № 3. С. 487–502.
40. Ченцов Ю. С., 2004. Введение в клеточную биологию. М.: Академкнига, 495 с.
41. Черкашина О. Н., 2007. Цитогенетический мониторинг насаждений сосны обыкновенной в условиях Хреновского и Усманского боров: Автореф. канд. дис. Воронеж, 22 с.
42. Шафикова Л. М., Калашник Н. А., 2000. Характеристика кариотипа сосны обыкновенной из условий промышленного загрязнения // Лесоведение. № 2. С. 30–36.
43. Эрн А., Раук Ю., 1986. Хвойные деревья индикаторы техногенной нагрузки в промышленном ландшафте // Изв. АН ЭССР. Сер. биол. Т. 35. № 2. С. 131–141.
44. Artukhovich V. G., Kalaev V. N., 2006. 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 // 20 Years after Chernobyl Accident: past, present and future. New York: Nova Science Publishers, C. 247–264.

45. *Butorina A. K., Evstratov N.*, 1996. The first detected case of amitosis in pine // *Forest Genetics*. Vol. 3. № 3. P. 137–139.
46. *Butorina A. K., Kalaev V. N., Najdenova O. S., Myagkova O. E. et al.*, 2000. Relationship between cytogenetic anomalies in forest trees subjected to radioactive contamination and industrial pollution with inherent defects in human infants in Central Russia // *Cytogenetic Studies of Forest Trees and Shrubs. Review, Present Status, and Outlook on the Future* (special issue of the *Forest Genetics*). Zvolen. P. 35–41.
47. *Kalaev V. N., Butorina A. K.*, 2006. Cytogenetic effect of radiation in seed oak (*Quercus robur L.*) trees growing on sites contaminated by Chernobyl Fallout // *Silvae Genetica*. Vol. 55. № 3. P. 93–148.

Cytogenetic response of seed progeny of scots pine to combined anthropogenic pollution in the area of Novolipetsk metallurgical combine

O. S. Mashkina, V. N. Kalaev, L. S. Muraya, E. S. Lelikova

✿ **SUMMARY:** The comparative estimation of variability cytogenetic parameters at seed progeny of pine ordinary from ecologically favorable and from industrial (Novolipetsk metallurgical combine — «NLMK») regions is carried out. It is established, that in progeny of pine trees growing in territory of «NLMK» there is an essential change of cytogenetic parameters in comparison with the control. It has been revealed that among seed progeny there are «mutable» and «low-mutable» forms. Questions of adaptation of seed progeny of pine ordinary trees to stressful factors at cellular and sub cellular levels are discussed.

✿ **KEY WORDS:** combined anthropogenic pollution; mitosis; mitotic activity; pathology of mitosis; nucleoli characteristics; Scots pine.

✿ Информация об авторах

Машкина Ольга Сергеевна — доцент.
Воронежский государственный университет, кафедра генетики, цитологии и биоинженерии.
394006, Воронеж, Университетская пл., д. 1.
E-mail: olga_mashkina@yahoo.com

Калаев Владислав Николаевич — доцент.
Воронежский государственный университет, кафедра генетики, цитологии и биоинженерии.
394006, Воронеж, Университетская пл., д. 1.
E-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Мурая Лидия Стефановна — инженер.
Воронежский государственный университет, кафедра генетики, цитологии и биоинженерии.
394006, Воронеж, Университетская пл., д. 1.
E-mail: gen185@bio.vsu.ru

Леликова Екатерина Сергеевна — студент.
Воронежский государственный университет, кафедра генетики, цитологии и биоинженерии.
394006, Воронеж, Университетская пл., д. 1.
E-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Mashkina Olga Sergeevna — associate professor.
Voronezh State University,
Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394006, Russia.
E-mail: E-mail: olga_mashkina@yahoo.com

Kalaev Vladislav Nikolaevich — associate professor.
Voronezh State University,
Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394006, Russia.
E-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Muraya Lidiya Stefanovna — engineer.
Voronezh State University,
Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394006, Russia.
E-mail: gen185@bio.vsu.ru

Lelikova Ekaterina Sergeevna — student.
Voronezh State University,
Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394006, Russia.
E-mail: Dr_Huixs@mail.ru