

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНТЕРКАЛЯРНЫХ И АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ЯЧМЕНЯ ДЛЯ БИОИНДИКАЦИИ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СВИНЦА

© В.Г. Дикарев, С.А. Гераськин, А.В. Дикарев, Н.С. Дикарева

Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск

Для цитирования: Дикарев В.Г., Гераськин С.А., Дикарев А.В., Дикарева Н.С. Сравнительный анализ эффективности использования интеркалярных и апикальных меристем ячменя для биоиндикации генотоксического действия свинца // Экологическая генетика. — 2018. — Т. 16. — № 3. — С. 37–46. doi: 10.17816/ecogen16337-46.

Поступила в редакцию: 22.05.2018

Принята к печати: 30.07.2018

✿ В вегетационном опыте сопоставлена эффективность использования интеркалярной и апикальной меристем ячменя для биоиндикации загрязнения почвы свинцом. Показано, что формы дозовых зависимостей для частоты абберантных клеток в интеркалярной и апикальной меристемах в исследованном диапазоне концентраций свинца качественно совпадают, а митотический индекс меняется незначительно. Воздействие свинца приводит к возникновению цитогенетических аномалий, главным образом связанных с повреждением веретена деления. Показана чувствительность и информативность апикальной и интеркалярной меристем в качестве тест-систем для оценки воздействия тяжелых металлов на сельскохозяйственные растения. Для мониторинга действия тяжелых металлов предпочтительно использовать интеркалярные меристемы, как более чувствительные; а для прогноза продуктивности — апикальные. Полученные данные позволяют рекомендовать использование цитогенетического анализа образовательных тканей растений в качестве надежного и информативного инструмента для оценки последствий техногенного загрязнения аграрных экосистем и исследования механизмов устойчивости живых объектов к повреждающим факторам среды.

✿ **Ключевые слова:** ячмень; свинец; биоиндикация; интеркалярная и апикальная меристемы.

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFECTIVENESS OF BARLEY INTERCALAR AND APICAL MERISTEMS APPLYING FOR BIOINDICATION OF LEAD INFLUENCE GENOTOXICITY

© V.G. Dikarev, S.A. Geras'kin, A.V. Dikarev, N.S. Dikareva

Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia

For citation: Dikarev VG, Geras'kin SA, Dikarev AV, Dikareva NS. The comparative analysis of effectiveness of barley intercalar and apical meristems applying for bioindication of lead influence genotoxicity. *Ecological genetics*. 2018;16(3):37-46. doi: 10.17816/ecogen16337-46.

Received: 22.05.2018

Accepted: 30.07.2018

✿ **Background.** Lead is the one of the major pollutants in natural and artificial ecosystems, but mechanisms of its influence on the plant organism still aren't completely clear. With the growing industrial pollution of the environment, and in particular, arable lands, the methods of bioindication of chemical compounds influence on the plant organism are obtained a big significance in modern biology. The cytogenetic analysis is well proven method for assessment of the environmental stress. The current research was devoted to the analysis of the cytogenetic aberrations bounds with the biometric and biochemical indexes and productivity of barley plants, which were grown on the lead polluted soil at terms of the vegetative experiment. An estimation of the comparative effectiveness of the barley plants intercalary and apical meristem applying for the indication of the lead toxicity are presented in the current work. **Materials and methods.** The vegetative experiment was carried on the barley plants variant Zazerskii 85 on the podzol loamy soil with the inserting of the nutrient elements and lead in the different concentrations at the form of salts. Plants were grown in the pots with the capacity of 5 kg by the standard methodic. For the cytogenetic analysis samples were taken on VI phase of the ontogenesis and fixed in the acetyl alcohol. Temporary squashed preparations was stained with the acetoorsein and examined by the microscope. Frequencies of the cytogenetic anomalies and aberrant cells were scored. **Results.** It was shown, that forms of dose curves of the frequencies of the aberrant cells at the intercalary and apical meristems are compatible and changes of the mitotic index aren't significant. A major part of the cytogenetic anomalies are bound with the division spindle breaches. A suitability of the apical and intercalary meristems for the assessment of the heavy metals influence on the agricultural plants was proven. **Conclusions.** On the base of collected data the cytogenetic analysis can be recommended as the reliable tool for the assessment of the industrial pollution consequences

for the agricultural ecosystems and for the researching of the mechanisms of the living objects response to the environmental stress. For the heavy metals influence monitoring the intercalary meristems is preferable as more sensitive, but for plants productivity prognosis the apical meristems is suitable.

✿ **Keywords:** barley; lead; bioindication; intercalary and apical meristem.

ВВЕДЕНИЕ

Свинец является одним из наиболее опасных загрязнителей наземных и водных экосистем. Источники его поступления в окружающую среду — естественная эрозия горных пород, выбросы автотранспорта, промышленных и сельскохозяйственных предприятий и др. [1]. В почвах сельскохозяйственных угодий содержание свинца может достигать 400–800 мг/кг, в почвах промышленных зон — более 1000 мг/кг [2].

В связи с усиливающимся техногенным загрязнением среды и, в частности, сельскохозяйственных угодий большое значение приобретают методы биоиндикации [3]. Для целей биоиндикации используют тест-объекты и тест-системы, позволяющие оперативно и надежно выявлять биологические и экологические последствия изменения параметров окружающей среды. В этой связи цитогенетические показатели обладают значительными преимуществами, поскольку мало подвержены влиянию погодных условий, но обладают высокой чувствительностью к действию широкого спектра техногенных поллютантов. Кроме того, цитогенетические показатели позволяют оценить состояние наследственных структур растений, определяющих как непосредственные реакции растительного организма на действие ксенобиотиков, так и отдаленные последствия, особенно значимые для судьбы популяции.

Нами был проведен вегетационный эксперимент, одной из целей которого был анализ связи цитогенетических нарушений в клетках интеркалярной и апикальной меристем ярового ячменя с изменениями биометрических, биохимических показателей и продуктивности растений, выращенных на загрязненной свинцом почве. В настоящей работе представлены результаты оценки сравнительной эффективности интеркалярных и апикальных меристем ярового ячменя для биоиндикации загрязнения свинцом почв сельскохозяйственных угодий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент по изучению влияния загрязнения почвы свинцом на рост, развитие, биохимические, цитогенетические показатели и продуктивность ярового двурядного ячменя сорта Зазерский 85 белорусской селекции был осуществлен на дерново-подзолистой супесчаной почве. Растения выращивали в пластиковых сосудах емкостью 5 кг по общепринятой методике [4, 5]. Валовое содержание свинца в контрольной почве составляло 8,60 мг/кг почвы. При закладке

опыта почву тщательно перемешивали и вносили в нее питательные элементы в виде водных растворов солей NH_4NO_3 , KCl и KH_2PO_4 из расчета по 0,2 г N, P_2O_5 и K_2O на кг абсолютно сухой почвы. При внесении в почву питательных веществ учитывали и корректировали количество азота, поступающее с раствором соли свинца. Свинец добавляли в дерново-подзолистую почву в виде водного раствора соли $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в шести концентрациях — 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 мг/кг почвы. Контролем служил вариант с NPK без внесения свинца. Опыт проводили в четырехкратной повторности, в каждой повторности было по 10 растений. Перед посевом почву инкубировали в течение 14 суток при температуре 20–23 °С и влажности 60 % полной влагоемкости. Растения выращивали до полной спелости в условиях постоянной влажности почвы (60 % полной влагоемкости). Положение вегетационных сосудов ежедневно меняли по схеме, обеспечивающей однородные условия роста и развития растений. Растения поливали дистиллированной водой [6].

Пробы для цитогенетического анализа интеркалярных меристем листьев отбирали по достижении растениями фазы «выход в трубку». Пробы фиксировали в фиксаторе Кларка (3 части 96 % этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты). Цитогенетический анализ проводили на временных давленных микроскопических препаратах, окрашенных ацетоорсеином [7]. Пробы растений для биометрического и биохимического анализов отбирали через 20 суток после всходов.

Цитогенетический анализ апикальных меристем корня проростков ячменя проводили с использованием семян, полученных с тех же растений, на которых был выполнен анализ интеркалярных меристем. Семена проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой в чашках Петри в термостате при 24 °С. В фиксаторе Кларка фиксировали корни длиной ≈ 10 мм. Временные давленные препараты кончиков корней окрашивали ацетоорсеином. При цитогенетическом анализе как интеркалярных, так и апикальных меристем определяли частоту аберрантных клеток, спектр и частоту цитогенетических аномалий (одиночных и двойных фрагментов и мостов, отстававший хромосом, мультиполярных митозов, слипаний хромосом, нерасхождений хромосом, неправильных расхождений хромосом, патологических анафаз) [7–10]. В настоящем исследовании рассматриваются некоторые нетипичные нарушения, нечасто наблюдаемые в цитогенетической практике, для которых нет устоявшейся

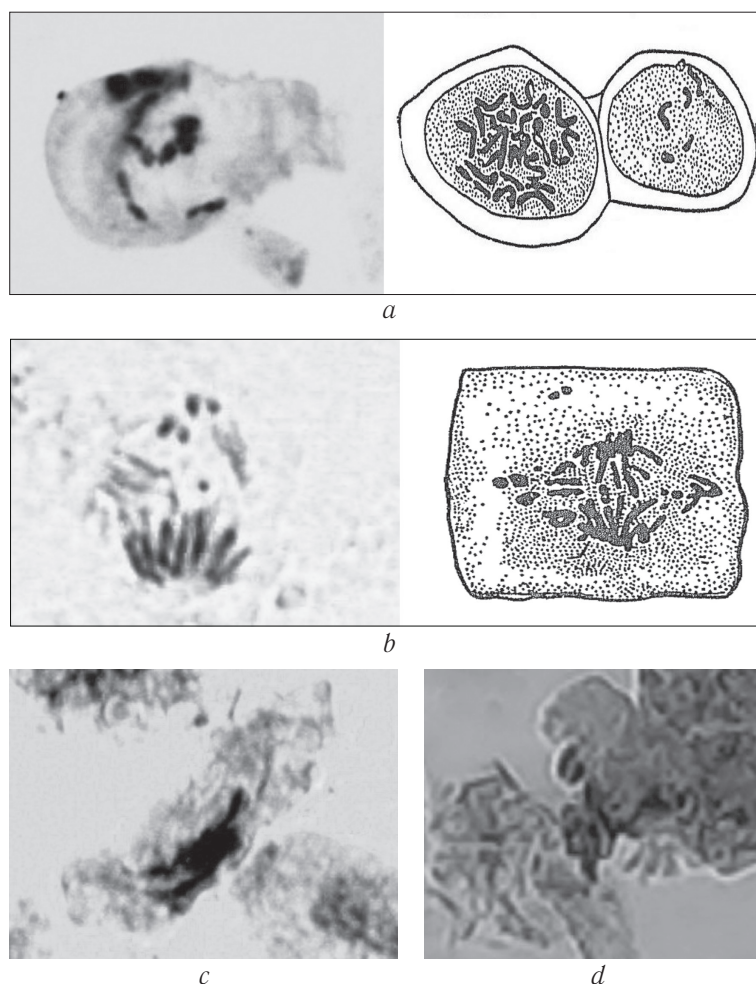


Рис. 1. Нетипичные разновидности цитогенетических аномалий: *a* — неправильное расхождение хромосом; *b* — патологическая анафаза; *c* — слипание хромосом; *d* — нерасхождение хромосом

Fig. 1. Atypical species of cytogenetic anomalies: *a* — incorrect chromosome divergence; *b* — pathologic anaphase; *c* — chromosome agglutinations; *d* — indivergence of chromosomes

терминологии. Например, термин «патологическая анафаза» предложен в работе [9], агглютинации описаны в работе [8] как adherence. Изображения нетипичных разновидностей цитогенетических нарушений представлены на рис. 1 (для наглядности приводится фотография и рисунок).

При уборке урожая через 90 суток после всходов определяли структуру урожая по следующим показателям: высота растений, число стеблей общее и число продуктивных стеблей, масса колосьев, масса соломы; число колосьев общее и число колосьев с зерном, масса зерна и число зерен с растения.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли стандартными методами с использованием пакета MS Excel. На графиках и диаграммах приведены среднеарифметические значения в расчете на одно растение и доверительные интервалы определяемых показателей в процентах к контролю при 95 % уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитогенетический анализ. Результаты оценки частоты и спектра цитогенетических нарушений в интеркалярной и апикальной меристемах ярового ячменя в зависимости от содержания свинца в почве представлены в табл. 1 и 2.

Коэффициенты корреляции ЧАК в интеркалярной и апикальной меристемах с содержанием свинца в почве статистически значимы и равны $0,885 \pm 0,209$ и $0,965 \pm 0,084$ соответственно. Зависимости частоты aberrantных клеток в интеркалярной меристеме листьев и апикальной меристеме корней проростков ярового ячменя от содержания свинца в почве представлены на рис. 2. На рисунке для удобства сравнения концентрационных кривых использована вспомогательная ось ординат, на которой представлены значения ЧАК в апикальной меристеме.

Форма дозовых кривых для частоты aberrantных клеток (АК) в интеркалярной и апикальной меристемах качествен-

Таблица 1

Частота и спектр цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ячменя

Table 1

Frequencies and spectre of the cytogenetic breaches in the intercalary meristem of the barley plants

Дозы Pb, мг/кг почвы	ЧДК	АК	ЧАК	Частота нарушений на делящуюся клетку, %								
				f''	m'	m''	g	mp	ndis	agg	pata	and
0	7799	64	0,821	0,090	0,064	0,244	0,218	0,000	0,000	0,256	0,013	0,038
100	3386	72	2,126	0,236	0,089	0,620	0,354	0,089	0,148	0,856	0,030	0,148
250	3226	137	4,247	0,000	0,000	0,620	0,558	0,589	0,217	2,852	0,031	0,062
500	3293	197	5,982	0,000	0,030	0,607	0,213	0,213	0,243	5,011	0,182	0,091
1000	2747	177	6,443	0,036	0,073	0,582	0,692	0,400	0,146	4,441	0,255	0,218
1500	4881	316	6,474	0,123	0,061	0,471	0,574	1,434	0,041	3,811	0,143	0,123
2000	4947	412	8,328	0,000	0,000	0,445	0,303	0,728	0,081	6,913	0,222	0,121
Коэф. кор. *			0,885	-0,314	-0,331	-0,069	0,246	0,727	-0,268	0,826	0,754	0,399

Примечание. * Корреляция показателя с концентрацией свинца в почве. Сокращения здесь, в табл. 2 и далее в тексте: ЧДК — число делящихся клеток; ЧАК — частота клеток с цитогенетическими аномалиями; f'' — двойные фрагменты; m' — одиночные мосты; m'' — двойные мосты; g — отставания хромосом; mp — мультиполярные митозы; ndis — нерасхождение хромосом; agg — слипание хромосом; pata — патологические анафазы; and — неправильное расхождение хромосом. Здесь и далее во всех таблицах жирным шрифтом выделены типы нарушений, для которых характерны высокие коэффициенты корреляции с концентрацией свинца в почве ($p \leq 0,05$)

Note. * Correlation of the index with the lead concentration in soil. The meaning of abbreviations here, at table 2 and onward in the text are follows: FPC — frequency of proliferating cells; FAC — frequency of cells with cytogenetic anomalies; f'' — double fragments; m' — single bridges; m'' — double bridges; g — chromosomal laggings; mp — multipolar mitosis; ndis — non-divergence of chromosomes; agg — chromosomes agglutinations; pata — pathological anaphases; and — incorrect divergence of chromosomes. Here and onward at all tables with the bold print are highlighted such types of breaches, that have a high correlation values with the lead concentration in soil ($p \leq 0.05$)

Таблица 2

Частота и спектр цитогенетических нарушений в апикальной меристеме ячменя

Table 2

Frequencies and spectre of the cytogenetic breaches in the apical meristem of the barley plants

Дозы Pb, мг/кг почвы	ЧДК	АК	ЧАК	Частота нарушений на делящуюся клетку, %								
				f''	m'	m''	g	mp	ndis	agg	pata	and
0	11198	98	0,875	0,152	0,089	0,152	0,554	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
100	10891	99	0,909	0,110	0,220	0,092	0,413	0,073	0,018	0,000	0,037	0,028
250	10188	97	0,952	0,098	0,118	0,098	0,491	0,177	0,020	0,010	0,029	0,020
500	9304	96	1,032	0,086	0,204	0,086	0,494	0,086	0,043	0,000	0,075	0,043
1000	9091	98	1,078	0,121	0,154	0,132	0,550	0,088	0,011	0,044	0,044	0,022
1500	7522	95	1,263	0,053	0,213	0,199	0,638	0,093	0,027	0,053	0,093	0,013
2000	6139	98	1,596	0,049	0,000	0,445	0,303	0,728	0,081	0,016	0,130	0,228
Коэф. кор.			0,965	-0,800	-0,372	0,823	-0,709	0,726	0,726	0,637	0,898	0,708

но совпадает и состоит из трех отчетливо различающихся участков (см. рис. 2). Первый участок в диапазоне низких концентраций свинца (до 500 мг/кг) характеризуется быстрым ростом частоты АК (более чем в 7 раз по сравнению с контролем для интеркалярной меристемы). Для апикальной меристемы увеличение частоты АК составило меньшую величину (в 1,2 раза). В диапазоне средних концентраций свинца (500–1500 мг/кг для интеркалярной и 500–1000 мг/кг для апикальной меристемы) наблюдается практически дозозависимое в пределах погрешностей плато. Третий участок дозовой

зависимости характеризуется увеличением частоты АК пропорционально содержанию свинца в почве. Аналогичная концентрационная кривая была получена при цитогенетическом анализе клеток апикальных меристем ячменя в нашей предыдущей работе [11]. Сходные результаты в вегетационном опыте были получены в наших более ранних работах на интеркалярной меристеме ячменя [12], где тоже наблюдалось подразделение кривой выхода aberrantных клеток на три участка, однако выход кривой на плато наблюдался при более низких дозах свинца (200 мг/кг). В основном увеличение ча-

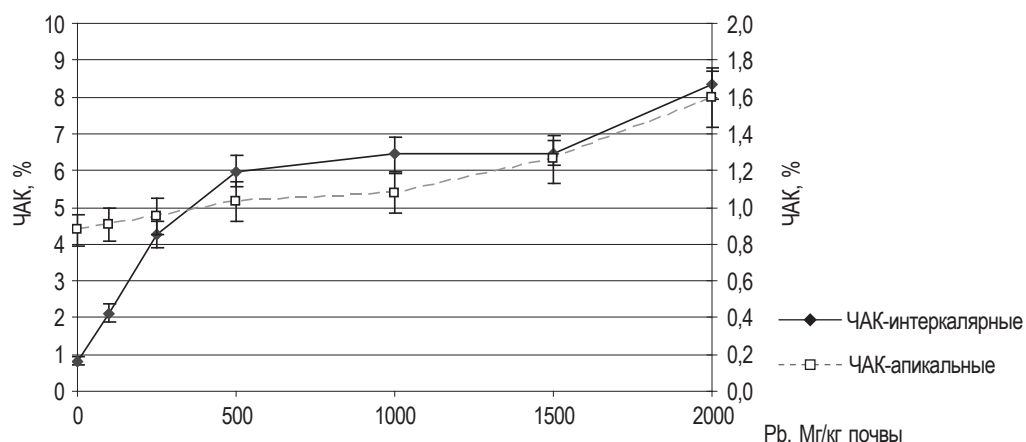


Рис. 2. Частота клеток с aberrациями в интеркалярной и апикальной меристемах в зависимости от содержания свинца в почве (на левой оси ординат представлены значения ЧАК — частоты aberrантных клеток — в интеркалярной меристеме, на правой — в апикальной)

Fig. 2. A frequency of the aberrant cells in the intercalary and apical meristems in dependence of the lead content in soil (at the left axis a value of FAC — frequency of aberrant cells — is presented for the intercalary meristem; at the right — same for the apical meristem)

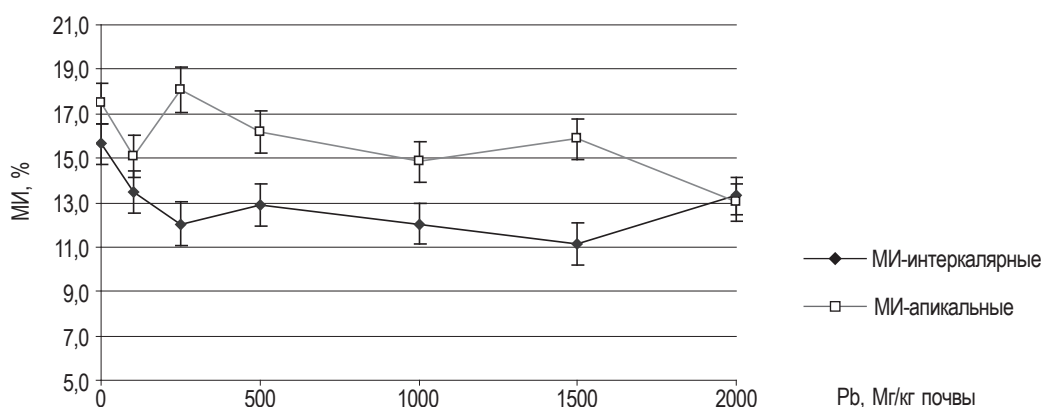


Рис. 3. Изменение митотического индекса (МИ) в интеркалярной и апикальной меристемах ячменя в зависимости от содержания свинца в почве

Fig. 3. Changes of the mitotic index (MI) at the intercalary and apical meristem of the barley plants in dependence of the lead content in soil

стоты aberrантных клеток связано с повреждением аппарата веретена деления (табл. 1 и 2).

Митотический индекс (МИ) в клетках апикальной меристемы испытывал разнонаправленные колебания, но при этом находился в среднем на уровне контроля (рис. 3). Лишь при максимальной дозе свинца (2000 мг/кг) МИ становится значимо ниже контрольного уровня. Для МИ интеркалярной меристемы были характерны иные закономерности. Уже минимальная доза свинца (100 мг/кг почвы) вела к снижению величины МИ, но в дальнейшем этот показатель существенно не менялся вплоть до 2000 мг/кг. В целом МИ под действием свинца снижался, однако концентрации свинца в почве, которые вели к статистически значимому снижению величины МИ, существенно различались для апикальной и интеркалярной меристем.

Частота aberrантных клеток в апикальных и интеркалярных меристемах является надежным и чувстви-

тельным тестом на повреждающее действие различных ксенобиотиков и широко используется в токсикологии химических токсикантов. Дополнительные сведения о действии повреждающих факторов можно получить из анализа спектра цитогенетических нарушений. Свинец вызывает множественные нарушения генетического аппарата [13]. Помимо регистрируемых анафазным методом традиционных нарушений — мосты, фрагменты (в исследовании были отмечены только двойные фрагменты), отставания хромосом и редко встречающиеся мультиполярные, чаще всего трехполюсные, митозы, свинец вызывает задержку митотического цикла на стадии профазы, слипание (агломинацию), нерасхождение и неправильное расхождение хромосом, образование патологических анафаз (см. табл. 1). Особенно массовыми нарушениями в интеркалярной меристеме оказываются слипания хромосом (agg), что позволяет причислить свинец к разряду сильных митотических ядов. При этих

повреждениях хромосомы вследствие набухания теряют свои нормальные очертания и слипаются, превращаясь в комковатые массы. В этом случае расхождения хромосом не происходит и клетки погибают [10]. Этот тип нарушений с увеличением концентрации свинца становится преобладающим и при максимальном уровне загрязнения почвы составляет 78 % от всех нарушений. Слипания хромосом вследствие их преобладания в спектре можно считать маркером действия свинца в клетках интеркалярной меристемы. В спектре интеркалярных меристем ячменя можно также выделить два других типа нарушений — мультиполярные митозы (mp) и патологические анафазы (pata), для которых также характерна высокая частота встречаемости при действии свинца. В апикальных меристемах слипание хромосом практически не встречается. По-видимому, эти тяжелые цитогенетические нарушения элиминируются в мейозе и митозе при формировании генеративных органов. Это обстоятельство снижает информативность цитогенетического анализа апикальных меристем

по сравнению с интеркалярными в целях биоиндикации воздействия ксенобиотиков.

В апикальных меристемах тесно связанных с дозой типов нарушений гораздо больше. Это патологические анафазы (pata), двойные фрагменты (f''), двойные мосты (m''), мультиполярные митозы (mp) и нерасхождение хромосом (ndis).

Хотя ячмень широко используют в токсикологических исследованиях в качестве стандартного тест-объекта для определения токсичности поллютантов, индикации воздействия в популяционных исследованиях [14], интерес представляет также выяснение влияния ТМ, в частности, свинца на продуктивные качества ячменя как сельскохозяйственной культуры. Была установлена статистически значимая корреляция разных типов цитогенетических нарушений в апикальной (но не интеркалярной) меристеме с показателями продуктивности ячменя (табл. 3 и 4). Это свидетельствует о тесной взаимосвязи изученных показателей действия свинца на разных уровнях биологической организации.

Таблица 3

Взаимосвязь цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме с концентрацией свинца в почве и показателями продуктивности ячменя

Table 3

An interrelation of the cytogenetic breaches in the intercalary meristem with the lead concentration in soil and indexes of barley productivity

Показатели продуктивности	Цитогенетические нарушения				
	ЧАК	ЧВА	ЧХН	ЧМН	АGG
Концентрация Рb	0,885	0,826	0,860	0,829	0,826
Урожай зерна с варианта	-0,562	-0,569	-0,585	-0,327	-0,562
Урожай зерна с побега	0,670	0,602	0,595	0,449	0,670
Урожай зерна с продуктивного побега	0,545	0,439	0,478	0,141	0,545
Масса соломы	-0,741	-0,714	-0,659	-0,734	-0,707

Примечание. ЧАК — частота клеток с абберациями в %; ЧВА — частота суммы аббераций всех типов в %; ЧХН — частота хромосомных нарушений в %; ЧМН — частота нарушений митотического аппарата в %
Note. FAC — frequency of cells with aberrations, %; FAA — frequency of the sum of all types of aberrations, %; FCB — frequency of chromosomal breaches, %; FMB — frequency of mitotic apparatus breaches, %

Таблица 4

Взаимосвязь цитогенетических нарушений в апикальной меристеме с концентрацией свинца в почве и показателями продуктивности ячменя

Table 4

An interrelation of the cytogenetic breaches in the apical meristem with the lead concentration in soil and indexes of barley productivity

Показатели продуктивности	Цитогенетические нарушения					
	ЧАК	ЧВА	ЧХН	ЧМН	f	АGG
Концентрация Рb	0,965	0,969	0,931	0,781	-0,861	0,556
Урожай зерна с варианта	-0,283	-0,300	0,029	-0,578	0,501	-0,030
Урожай зерна с побега	0,928	0,914	0,848	0,763	-0,567	0,208
Урожай зерна с продуктивного побега	0,749	0,736	0,453	0,846	-0,654	-0,258
Масса соломы	-0,953	-0,955	-0,934	-0,750	0,850	-0,448

ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка эффективности использования интеркалярной меристемы для биоиндикации была вызвана рядом преимуществ, которыми она обладает по сравнению с апикальной меристемой корешков проростков. В последнем случае мы имеем дело с отложенным во времени эффектом воздействия на родительский организм, исследуя нарушения в его потомстве. Анализируя интеркалярную меристему, можно исследовать действие ТМ непосредственно в онтогенезе растений. Однако учитывая, что цитогенетический анализ апикальных меристем широко используется в токсикологии, экологии и генетике, насущной задачей становится оценка сравнительной ценности этих тест-систем для индикации воздействия ксенобиотиков на окружающую среду.

При обсуждении механизмов действия свинца на генетический аппарат клеток стоит обратить внимание на то, что эффективность этого действия в диапазоне низких концентраций неизмеримо выше, чем в диапазоне 500–1500 мг/кг, в котором концентрация возрастает в три раза, а ЧАК остается на одном и том же уровне. Можно предположить, что такая форма кривой связана с включением индуцибельных систем репарации [15].

Частота аберрантных клеток в интеркалярных меристемах при максимальной концентрации свинца в 10 раз выше, чем в контроле. В то же время в апикальных меристемах это соотношение составляет 1,8 раза при практически одинаковом уровне частоты аберрантных клеток в контроле в обеих меристемах (0,821 и 0,875 %).

Полученные в нашем исследовании зависимости частоты аберрантных клеток в интеркалярной и апикальной меристемах ячменя от содержания свинца в почве сходны по форме с полученными нами ранее дозовыми зависимостями на проростках ячменя при γ -облучении [16, 17] и действии свинца [11, 18]. Показано, что между концентрацией свинца в почве и ЧАК, а также частотой суммы аберраций всех типов, частотой нарушений хромосом, частотой нарушений митотического аппарата существует статистически значимая корреляционная связь. Это доказывает, что воздействие свинца затрагивает в первую очередь генетические структуры клеток растений.

Значимые коэффициенты корреляции были обнаружены между разными типами цитогенетических нарушений в апикальной меристеме корня проростков и урожаем зерна, а также урожаем зерна в расчете на один побег. Этот показатель достаточно точно характеризует воздействие свинца на продуктивность растений ячменя, о чем свидетельствуют высокие коэффициенты корреляции (0,848–0,928). По-видимому, это можно объяснить подавлением апикального доминирования и усилением кущения, в результате чего урожай в расчете на побег снижается с увеличением концентрации

свинца в почве. Интеркалярная меристема оказалась более чувствительной, чем апикальная, но апикальная имеет статистически более значимую связь с продуктивностью и является более ценной тест-системой для прогнозирования продуктивности.

Кроме традиционных нарушений, регистрируемых анафазным методом, таких как мосты, фрагменты, отставания хромосом и редко встречающиеся мультиполярные, чаще всего трехполюсные, митозы, свинец вызывает задержку митотического цикла на стадии профазы, слипание (агломинацию), нерасхождение и неправильное расхождение хромосом, образование патологических анафаз.

Повышенная частота наблюдаемых патологий митоза обычно обусловлена воздействием на клетки химических мутагенов, ионизирующего излучения, вирусных инфекций и других стрессов, например переохлаждения [10, 19]. Так, при действии ионизирующего излучения обычно наблюдается снижение митотической активности, а при возобновлении деления — увеличение частоты патологических митозов. Причем основное число нарушений связано с повреждениями хромосом: фрагментацией, набуханием, слипанием и образованием мостов [20, 22]. Другие типы нарушений отмечаются с меньшей частотой. Увеличение частоты аберраций хромосом наблюдалось и при заражении клеточной культуры вирусами [23], в этом случае число патологических митозов возросло с 3 % в контроле до 40–60 % в инфицированной культуре. Массовая фрагментация хромосом при вирусных инфекциях описана во многих работах [24–28]. Аналогичные эффекты зафиксированы при действии химических мутагенов, таких как ингибиторы предшественников пуриновых кислот (5-аминоурацил, азасерин, азагуанин, 6-меркаптопурин) и аналоги азотистых оснований, способные включаться в ДНК (5-бромурацил, 2,6-диаминопурин, 5-дезоксисуридин) [29–32]. На основании этих данных можно ожидать, что фрагментация хромосом обусловлена повреждением молекулы ДНК либо хроматина. Связь фрагментации с нарушением нуклеопротеидного обмена впервые рассмотрел Дж. Бизеле [33]. Подобные явления имеют место при действии химических мутагенов, ионизирующей радиации или при патологических процессах в организме. Так, в культуре животных клеток, претерпевающих трансформацию в раковые, количество фрагментов может достигать 44 % от общего числа патологических митозов [34].

В настоящем исследовании были получены убедительные доказательства повышенной чувствительности интеркалярных меристем злаков по сравнению с апикальными при биоиндикации воздействия свинца. Еще одним преимуществом этой тест-системы является высокая оперативность индикации воздействия. У культурных злаков воздействие повреждающих факторов можно обнаружить уже через 2–3 недели после посева

(фаза выхода в трубку). У озимых злаков чувствительность метода может повыситься за счет удлинения срока воздействия повреждающих агентов в зимний период и индикации воздействия при возобновлении вегетации весной. У дикорастущих злаков это воздействие может быть обнаружено вскоре после начала весеннего отрастания листьев. У многолетних злаков чувствительность биоиндикации с помощью цитогенетического анализа может быть более высокой за счет накопления редких нарушений в течение нескольких сезонов вегетации. Еще одно преимущество интеркалярных меристем заключается в их высокой чувствительности к воздействию в области малых концентраций и доз повреждающих воздействий. Так, в диапазоне концентраций свинца до 500 мг/кг почвы частота aberrантных клеток в этих меристемах возрастала более чем в 7 раз по сравнению с контролем, а в диапазоне 500–2000 мг/кг — всего в 1,2 раза. При этом концентрация свинца в почве в первом диапазоне возрастает в 5–8 раз, а во втором — в 4 раза.

ВЫВОДЫ

За последние годы представления о механизмах устойчивости растений к свинцу и его метаболизме в растительном организме существенно расширились. Настоящая работа дополняет имеющиеся сведения в отношении цитогенетических эффектов свинца. Выяснилось, что формы дозовых зависимостей для использованных тест-систем — апикальной и интеркалярной меристем — качественно совпадают. Токсическое действие свинца проявлялось в снижении МИ, однако концентрации свинца в почве, которые вели к статистически значимому снижению величины МИ, существенно различались для апикальной и интеркалярной меристемы. Кроме обычных нарушений, часто фиксируемых в цитогенетической практике (фрагменты, мосты, отставания хромосом), свинец вызывает задержку продвижения по митотическому циклу, что приводит к повреждению аппарата веретена деления. Выявлены корреляционные связи между концентрацией свинца и показателями, характеризующими митотическую активность клеток меристем.

Из представленных в работе данных следует, что апикальная и интеркалярная меристемы показали себя надежными и чувствительными тест-системами для оценки воздействия тяжелых металлов на сельскохозяйственные растения. Их применение не требует высоких трудовых и финансовых затрат или сложной подготовки персонала и позволяет получить интересные данные о влиянии факторов окружающей среды на растительный организм. При этом обнаружить указанные эффекты с помощью таких тест-систем возможно даже в случае, когда токсический стресс еще не проявляется на биохимическом или организменном уровне. Использование в работе по оценке токсических эффектов

образовательных тканей как вегетирующих растений, так и потомков особей, подвергшихся стрессу, дает возможность получить более полные сведения об ответе на стресс, поскольку данные по этим тест-системам дополняют друг друга. В силу вышеизложенного можно рекомендовать цитогенетический анализ образовательных тканей растений в качестве надежного инструмента для оценки последствий техногенного загрязнения аграрных экосистем и исследования механизмов устойчивости живых объектов к повреждающим факторам среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eick MJ, Peak JD, Brady PV, Pesek JD. Kinetics of Lead Adsorption/Desorption on Goethite: Residence Time Effect. *Soil Science*. 1999;164(1):28-39. doi: 10.1097/00010694-199901000-00005.
2. Angelon M, Bini C. Trace elements concentrations in soils and plants of western Europe. In: Biogeochemistry of Trace Metals. Ed by D.C. Adriano. London: Lewis Publishers, Boca Raton; 1992. P. 19-60.
3. Гераськин С.А., Сарапульцева Е.И. Биологический контроль окружающей среды. Генетический мониторинг. — М.: Академия, 2010. [Geras'kin SA, Sarapul'tseva EI. Biologicheskii kontrol' okruzhayushchey sredy. Geneticheskii monitoring. Moscow: Akademiya; 2010. (In Russ.)]
4. Журбицкий З.И. Теория и практика вегетационного метода. — М.: Наука, 1968. [Zhurbitskiy ZI. Teoriya i praktika vegetatsionnogo metoda. Moscow: Nauka; 1968. (In Russ.)]
5. Тюрин И.В. Агрохимические методы исследования почв. — М.: Наука, 1975. [Tyurin IV. Agrokhimicheskie metody issledovaniya pochv. Moscow: Nauka; 1975. (In Russ.)]
6. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. — М.: Издательство МГУ, 1970. [Ari-nushkina EV. Rukovodstvo po khimicheskomu analizu pochv. Moscow: Izdatel'stvo MGU; 1970. (In Russ.)]
7. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1974. [Pausheva ZP. Praktikum po tsitologii rasteniy. Moscow: Kolos; 1974. (In Russ.)]
8. Leme DM, Marin-Morales MA. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2009;682(1):71-81. doi: 10.1016/j.mrgrev.2009.06.002.
9. Атабекова А.И., Устинова Е.И. Цитология растений. — М.: Агропромиздат, 1987. [Atabekova AI, Ustinova EI. Tsitologiya rasteniy. Moscow: Agropromizdat; 1987. (In Russ.)]
10. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. — М.: Медицина, 1972. [Alov IA. Tsitofiziologiya i patologiya mitoz. Moscow: Meditsina; 1972. (In Russ.)]
11. Дикарев А.В., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С. Сравнительный анализ частоты цитогенетических эф-

- фектов в апикальной меристеме корешков проростков сортов ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.), контрастных по устойчивости к свинцу // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. — 2016. — Т. 177. — № 1. — С. 52–68. [Dikarev AV, Dikarev VG, Dikareva NS. Comparative analysis of the frequency of cytogenetic abnormalities in the root apical meristem of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivae seedlings, contrasting in their lead tolerance. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2016;177(1):52-68. (In Russ.)]
12. Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Удалова А.А. Влияние раздельного действия ионизирующего излучения и солей тяжелых металлов на частоту хромосомных aberrаций в листовой меристеме ярового ячменя // Генетика. — 1996. — Т. 32. — № 2. — С. 272–278. [Geras'kin SA, Dikarev VG, Dikareva NS, Udalova AA. Effect of ionizing irradiation or heavy metals on the frequency of chromosome aberrations in spring barley leaf meristem. *Russian journal of genetics*. 1996;32(2):272-278. (In Russ.)]
 13. Ибрагимова Э.Э. Митотическая активность клеток корневой меристемы *Allium cepa* L. при совместном действии пестицидов и тяжелых металлов // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология. Химия». — 2014. — Т. 27. — № 1. — С. 56–63. [Ibragimova EE. Mitotical activity of cells of root meristems of *Allium cepa* L. at the united action of pesticides and heavy metals. *Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. Series: Biology, Chemistry*. 2014;27(1):56-63. (In Russ.)]
 14. Geras'kin SA, Evseeva T, Oudalova A. Plants as a tool for the environmental health assessment. In: *Encyclopedia of Environmental Health*. Ed by J.O. Nriagu. Burlington: Elsevier; 2011. P. 571-579. doi: 10.1016/b978-0-444-52272-6.00612-7.
 15. Гераськин С.А. Концепция биологического действия малых доз ионизирующего излучения на клетки // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1995. — Т. 35. — № 5. — С. 571–580. [Geras'kin SA. The conception of biological influence of low doses of ionizing radiation at cells. *Radiation biology, radioecology*. 1995;35(5):571-580. (In Russ.)]
 16. Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Удалова А.А. Закономерности индукции малыми дозами ионизирующего излучения цитогенетических повреждений в корневой меристеме проростков ячменя // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1999. — Т. 39. — № 4. — С. 373–383. [Geras'kin SA, Dikarev VG, Dikareva NS, Udalova AA. A consistent pattern of cytogenetic breaches induction by low doses of ionizing radiation at root meristem of barley seedlings. *Radiation biology, radioecology*. 1999;39(4):373-383. (In Russ.)]
 17. Geras'kin SA, Oudalova AA, Kim JK, et al. Cytogenetic effect of low dose γ -radiation in *Hordeum vulgare* seedlings: non-linear dose–effect relationship. *Radiat Environ Biophys*. 2007;46(1):85-85. doi: 10.1007/s00411-007-0094-3.
 18. Дикарев А.В., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С. Влияние нитрата свинца на морфологические и цитогенетические показатели растений ярового двурядного ячменя (*Hordeum vulgare* L.) // Агрохимия. — 2014. — № 7. — С. 45–52. [Dikarev AV, Dikarev VG, Dikareva NS. Effect of lead nitrate on the morphological and cytogenetic parameters of spring two-row barley (*Hordeum vulgare* L.). *Agrokhimiya*. 2014;(7):45-52. (In Russ.)]
 19. Antosiewicz D, Wierzbicka M. Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy. *J Microsc*. 1999;195(2):139-146. doi: 10.1046/j.1365-2818.1999.00492.x.
 20. Marco C, Angelo P. Effetti differnti su mitosi vegetali di radiazioni di diversa energia. *Radiobiol Latina*. 1961;4(2):89.
 21. Nakanishi YH, Kato H. Unusual Movement of the Daughter Chromosome Group in Telophasic Cells Following the Exposure to Ultraviolet Microbeam Irradiation. *Cytologia*. 1965;30(2):213-221. doi: 10.1508/cytologia.30.213.
 22. Алексеева-Попова Н.В. Клеточно-молекулярные механизмы металлоустойчивости растений. Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов. — Л.: Ботанический институт им. В.Л. Комарова, 1991. [Alekseeva-Popova NV. Kletочно-molekulyarnye mekhanizmy metalloustoychivosti rasteniy. Ustoychivost' k tyazhelym metallam dikorastuschikh vidov. Leningrad: Botanicheskiy Institut im. V.L. Komarova; 1991. (In Russ.)]
 23. Блюмкин В.Н., Жданов В.М., Шубладзе А.К. Влияние некоторых вирусов на митотический режим клеточных культур // Материалы конференции по патологии клетки. — М.: Мир, 1967. [Blyumkin VN, Zhdanov VM, Shubladze AK. Vliyanie nekotorykh virusov na mitoticheskiy rezhim kletochnykh kul'tur. In: *Materialy konferentsii po patologii kletki*. Moscow: Mir; 1967. (In Russ.)]
 24. Moorhead PS, Saksela E. The Sequence of Chromosome Aberrations during Sv 40 Transformation of a Human Diploid Cell Strain1. *Hereditas*. 2009;52(3):271-284. doi: 10.1111/j.1601-5223.1965.tb01960.x.
 25. Cooper E, Black P. Cytogenetic studies of hamster kidney cell cultures transformed by the simian vacuolating virus (SV₄₀). *J Natl Cancer Inst*. 1963;30(5):1015. doi: 10.1093/jnci/30.5.1015.
 26. Aula P, Saksela E. Early Morphology of the Chromosome Damage Induced by Sendai Virus. *Hereditas*. 2009;55(2-3):362-366. doi: 10.1111/j.1601-5223.1966.tb02055.x.

27. Nichols WW, Levan A, Aula P, Norrby E. Chromosome Damage Associated with the Measles Virus in Vitro. *Hereditas*. 2009;54(1):101-118. doi: 10.1111/j.1601-5223.1965.tb02008.x.
28. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. — М.: Университет, 2007. [Poleskaya OG. Rastitel'naya kletka i aktivnye formy kisloroda. Moscow: Universitet; 2007. (In Russ.)]
29. Martinez-Pico LM, Duncan RE. The Structural Chromosome Aberrations Produced By 5-Aminouracil and Their Prevention by an Additional Thymine Source. *Cytologia*. 1955;20(4):378-391. doi: 10.1508/cytologia.20.378.
30. Deysson M. Action de la saponine A du *Sapindus Mukurossi* Gaertn. Sur la division des cellules végétales. *Bulletin de la Société Botanique de France*. 2014;97(7-9):190-191. doi: 10.1080/00378941.1950.10834806.
31. Шахова И.К. Возникновение мутаций и обмен веществ // Успехи современной биологии. — 1965. — Т. 60. — № 1. — С. 4. [Shakhova IK. Vozniknovenie mutatsiy i obmen veschestv. *Advances in modern biology*. 1965;60(1):4. (In Russ.)]
32. Феник С.И., Трофимьяк Т.Б., Блюм Я.Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Успехи современной биологии. — 1995. — Т. 115. — № 3. — С. 261–276. [Fenik SI, Trofimyak TB, Blyum YB. Mekhanizmy formirovaniya ustoychivosti rasteniy k tyazhelym metallam. *Advances in modern biology*. 1995;115(3):261-276. (In Russ.)]
33. Бизеле Дж. Индукция химическими веществами аномальных митозов, имитирующих митозы в раковых клетках. Генетика рака. — М.: Наука, 1961. [Bizele J. Indukciya himicheskimi veschestvami anomal'nyh mitozov, imitiruyuschih mitozy v rakovyh kletkah. *Genetika рака*. Moscow: Nauka; 1961. (In Russ.)]
34. Леван А., Бизеле Дж. Изучение роли хромосом в канцерогенезе. Генетика рака. — М.: Наука, 1961. — 273 с. [Levan A, Bizele J. Izuchenie roli khromosom v kantserogeneze. *Genetika рака*. Moscow: Nauka; 1961. 273 p. (In Russ.)]

✿ Информация об авторах

Владимир Григорьевич Дикарев — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория № 6. Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск. E-mail: ar.djuna@yandex.ru.

Станислав Алексеевич Гераськин — д-р биол. наук, профессор, заведующий, лаборатория № 6. Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск. E-mail: st.geraskin@gmail.com.

Алексей Владимирович Дикарев — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория № 6. Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск. E-mail: ar.djuna@yandex.ru.

Нина Сергеевна Дикарева — канд. с.-х. наук, научный сотрудник, лаборатория № 6. Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск. E-mail: ar.djuna@yandex.ru.

✿ Information about the authors

Vladimir G. Dikarev — S.S.C., PH.D. of B.S., Laboratory No 6. Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia. E-mail: ar.djuna@yandex.ru.

Stanislav A. Geras'kin — Sen. of Lab., Sc.D., Professor, Laboratory No 6. Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia. E-mail: st.geraskin@gmail.com.

Alexey V. Dikarev — S.S.C., PH.D. of B.S., Laboratory No 6. Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia. E-mail: ar.djuna@yandex.ru.

Nina S. Dikareva — S.S.C., PH.D. of A.S., Laboratory No 6. Russian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia. E-mail: ar.djuna@yandex.ru.