

## **ОЦЕНКА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ И СПОСОБНОСТИ К ПРОРАСТАНИЮ СЕМЯН ЯЧМЕНЯ ВЫРАЩИВАЕМОГО НА ДЕРНОВОПОДЗОЛИСТЫХ ПОЧВАХ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЦИНКА.**

**Васильев Д.В.**

Рост количества доступных для живых организмов форм тяжелых металлов в биосфере делает актуальными исследования их биологического влияния. Особенно важны такие исследования в отношении сельскохозяйственных растений, поскольку обеспечение населения в оптимальных количествах качественными продуктами питания во многом определяет стабильность развития общества.

Для оценки последствий воздействия ионов металлов на растения используют основанные на изучении ростовых процессов и цитогенетических повреждений показатели. При изучении индуцированного металлами мутагенеза наиболее адекватными признаны цитогенетические тест-системы растений. Они дают мало заведомо ложных результатов, позволяют получить воспроизводимые результаты об уровне загрязнения среды при мониторинге *in situ*, обнаружить ранние и в то же время наиболее серьезные последствия техногенного воздействия (Ma et al, 1995; Steinkellner et al, 1998; Kovalchuk et al, 2001; Grant, Owens, 2001, 2002). Выявление закономерностей возникновения цитогенетических повреждений и изменений ростовых процессов растений при действии металлов является, таким образом, важным этапом исследований, результаты которых требуются для обоснования решений в природоохранной деятельности и сельском хозяйстве.

В связи с этим нами была проведена оценка цитогенетических эффектов и способности к прорастанию семян ячменя, выращиваемого на дерновоподзолистых почвах с повышенным содержанием нитрата цинка.

## Материалы и методы

Изучали цитогенетические эффекты, всхожесть и энергию прорастания семян ячменя сорта «Зазерский 85», выращенного в вегетационном эксперименте на почвах, в которые был внесён водный раствор нитрата Цинка в концентрациях 25 и 50 100 150 и 250 мг/кг воздушно-сухой почвы.

Семена проращивали в термостате при 21°C в чашках Петри на смоченной дистиллированной водой фильтровальной бумаге. Энергию прорастания и всхожесть определяли на 3 и 7 сутки соответственно.

Для фиксации клеток в первом митозе использовали корешки длиной 1-1,5 см, которые фиксировали в ацето-алкоголе (1:3). Временные давленные препараты окрашивали ацетоорсеином. В препаратах анализировали все ана-телофазные клетки, в среднем 3 - 6 тысяч ана-телофаз на вариант и рассчитывали процент клеток с цитогенетическими нарушениями.

Анализ спектра нарушений проводили с выделением хроматидных (одиночных) и хромосомных (двойных) мостов и фрагментов, многополюсных митозов, а также отставаний хромосом. Клетки со сложными, (неподдающимися распознаванию) абберациями из анализа были исключены. Отметим, что анафазным методом в клетках корневой меристемы проростков регистрируются нарушения, возникшие в период от образования гамет до созревания и сбора семян, поскольку индуцированные на вегетативной стадии (до цветения) хромосомные перестройки элиминируются в мейозе за исключением не регистрируемых этим методом симметричных транслокаций и инверсий.

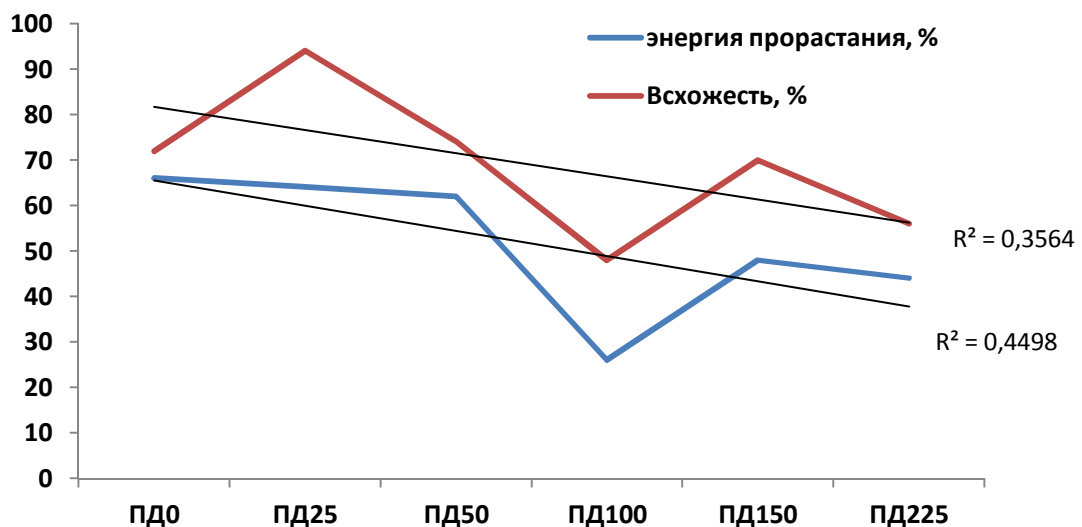
Статистический анализ проводился методами вариационной статистики с использованием MS Excel. Для определения оптимального объема выборки, необходимого для получения оценок изучаемых параметров с фиксированной относительной погрешностью при заданной доверительной вероятности, применяли методику статистического анализа эмпирических распределений (Гераськин и др., 1994). Экспериментальные данные были проверены на наличие выбросов, которые исключали из дальнейшего рассмотрения. Достоверность отличий оценивали с помощью критерия Стьюдента.

## Результаты

Можно ли ожидать у семян ячменя, выращенного на почвах, в которые вносился нитрат цинка, и не испытывающих при проращивании стрессового воздействия, появятся цитогенетические эффекты или изменения способности к прорастанию? Вероятность возникновения таких эффектов достаточно велика, ведь развитие семян происходило в тот период, когда растения испытывали стрессовое воздействие от повышенного содержания цинка в почве. Кроме того, хорошо известна (Molinier et al., 2006) способность растений сохранять память о пережитом стрессе и передавать эту информацию следующим поколениям. Например, однократная обработка химическими мутагенами семян сосны в сублетальных концентрациях индуцирует ответную реакцию, которая охватывает, как минимум, два поколения и проявляется в повышенной изменчивости признаков, частоте морфологических аномалий, низкой жизнеспособности и конкурентоспособности растений, и плохом качестве семян (Кузнецова, Машкина, 2011).

Одним из эффектов воздействия тяжелых металлов на семена растений является снижение их всхожести (Munzuroglu, Geckil, 2002). В нашем исследовании было установлено, что семена ячменя, выросшего на почвах в различной степени загрязненных цинком, имеют статистически значимо меньшую, по сравнению с контролем, энергию прорастания (табл. 1). Всхожесть семян также ниже, по сравнению с контролем, кроме концентрации 25 мг/кг вызвавшей статистически значимое увеличение всхожести (рис. 1).

**Рисунок 1.** Энергия прорастания и всхожесть семян ячменя



Проведенный нами цитогенетический анализ выявил статистически значимый рост числа хромосомных нарушений в клетках корневой меристемы проростков семян при концентрации цинка в почве от 100 мг/кг (табл. 1). Отсутствие эффектов при меньших концентрациях может быть объяснено тем, что цинк хотя и относится по классификации (Дж. Вуд, 1974) к очень токсичным элементам, активно накапливающимся в окружающей среде, в тоже время наряду с такими металлами как хром, медь или железо имеет важное значение для метаболизма растений и входит в состав ферментов (Мецлер, 1980). Поскольку цинк в определенных концентрациях необходим для растений, то и его генотоксическое воздействие проявляется только при достаточно высоких концентрациях в почве.

**Таблица 1.** Частота и спектр цитогенетических нарушений в корневой меристеме проростков семян ячменя

Вариант	ВК	АК, %	Относительный вклад разных типов аберраций %		
			f'+m'	f''+m''	g+mp
пд0	6299	0,75±0,07	15,38±0,06	40,38±0,08	44,23±0,07
пд25	5703	0,78±0,07	4,00±0,03	58,00±0,08	38,00±0,07
пд50	5677	0,82±0,08	10,00±0,07	41,67±0,08	48,33±0,08
пд100	3883	1,02±0,09*	12,28±0,06±	38,60±0,08	49,12±0,07
пд150	4754	0,98±0,10	14,55±0,08	36,36±0,07	49,09±0,07
пд250	3797	1,31±0,08***	11,67±0,05	31,67±0,06	56,67±0,05*

ВК – число просмотренных ана-телофазных клеток; АК – абберантные клетки;

f', m' – хроматидные (одиночные) фрагменты и мосты; f'', m'' – хромосомные (двойные)

фрагменты и мосты; g – отставания хромосом; mp – трехполюсные митозы

\* - отличие от контрольного участка статистически значимо: \* - p < 5%, \*\* - p < 1%, \*\*\* - p < 0,1%

Представляет интерес как изменяется спектр цитогенетических нарушений с ростом концентраций цинка в почвах на которых выращивался ячмень. Это позволит узнать проявляется ли при данных концентрациях специфика влияния цинка на спектр цитогенетических нарушений. Этот подход основан на том фундаментальном факте, что ни один из техногенных поллютантов не способен (Фогель, Мотульский, 1990) создать новые биологические феномены, т.е. новые типы мутаций, которые не наблюдались бы и в

контроле. Но вот соотношение разных типов мутаций при действии факторов разной природы может меняться весьма значительно.

Анализ спектра цитогенетических нарушений выявил рост хроматидных нарушений и незначительное снижение доли хромосомных нарушений с ростом концентрации цинка в почве. Однако достоверные отличия от контроля отмечены лишь при внесении в почву нитрата цинка не менее 250 мг/кг.

На основании полученных результатов можно сказать, что малые концентрации нитрата цинка (до 100 мг/кг) не оказали негативного влияния на всхожесть и способность к прорастанию семян выросшего на этих почвах ячменя. Цитогенетические эффекты статистически значимо начинают проявляться в корневой меристеме проростков семян только у растений, выросших на дерновоподзолистых почвах в которые вносилось не менее 100 мг/кг нитрата цинка. При концентрациях нитрата цинка в почве - 250 мг/кг наблюдалось статистически значимое увеличение числа хроматидных нарушений.

## **Литература**

- Гераськин С.А., Фесенко С.В., Черняева Л.Г., Санжарова Н.И. Статистические методы анализа эмпирических распределений коэффициентов накопления радионуклидов растениями // Сельскохозяйственная биология. 1994. № 1. С. 130-137.
- МецлерД. Биохимия. М.: Мир, 1980. Т. 1. 407 с.
- Grant W.F., Owens E.T. Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagenesis // Mutation research. 2001. V. 488. Suppl. 2. P. 93-118.
- Grant W.F., Owens E.T. *Lycopersicon* assays of chemical/radiation genotoxicity for the study of environmental mutagenesis // Mutation research. 2002. V. 511. Suppl. 3. P. 207-237.
- Kovalchuk I., Kovalchuk O., Hohn B. Biomonitoring the genotoxicity of environmental factors with transgenic plants // Trends in Plant Science. 2001. V. 6. P. 306-310.
- Ma T.H., Xu Z., Xu C., McConnell H., Rabago E.V., Arreola G.A., Zhang H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants // Mutation Research. 1995. V. 334. P. 185-195.
- Munzuroglu O. Geckil H. Effects of metals on seed germination, root elongation and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticumaestivum* and *Cucumissativus* // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2002. V. 43. P. 203-213.
- Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C., Ecker S., Ma T.H., Horak O., Kundi M., Knasmüller S. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays // Environmental and Molecular Mutagenesis. 1998. V. 31. P. 183-191.
- Wood J. M. Diologicalcycles for toxic elements in the invironment // Science 1974. Vol. 183. P. 1049-1059