

**ОЦЕНКА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ И СПОСОБНОСТИ К ПРОРАСТАНИЮ СЕМЯН
ЯЧМЕНЯ ВЫРАЩИВАЕМОГО НА ЧЕРНОЗЕМНОЙ ПОЧВЕ С ПОВЫШЕННЫМ
СОДЕРЖАНИЕМ ЦИНКА.**

Васильев Д.В.

Одним из негативных результатов развития промышленного производства является значительный рост уровня содержания тяжелых металлов в окружающей среде. В России площадь загрязнения тяжёлыми металлами почв сельскохозяйственных угодий составляет 3,6 млн. га. (Технологические, 2010). Увеличение в биосфере количества доступных для живых организмов форм тяжелых металлов делает актуальным изучение их биологического влияния. Особенно важны такие исследования в отношении сельскохозяйственных растений, поскольку стабильность развития общества во многом определяется тем как население обеспечивается качественными и безопасными для здоровья продуктами питания.

Для оценки последствий воздействия ионов металлов на растения в качестве интегральных критериев оценки токсичности используют показатели нарушения роста растений либо замедления митотической активности клеток меристем. При изучении индуцированного металлами мутагенеза наиболее адекватными признаны цитогенетические тест-системы растений. Они дают мало заведомо ложных результатов, позволяют получать воспроизводимые данные об уровне загрязнения среды при мониторинге *in situ*, обнаруживать 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 была проведена оценка цитогенетических эффектов и способности к прорастанию семян ячменя, выращиваемого на черноземной почве 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 50, 100, 250, 500 и 750 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 изучали митотическую активность и количество клеток с цитогенетическими нарушениями (анализировали все ана-телофазные клетки, в среднем 3 - 6 тысяч ана-телофаз на вариант). 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

Насколько велика вероятность, что у семян ячменя выращенного на почвах, в которые вносился нитрат цинка, и не испытывающих при проращивании стрессового воздействия, появятся цитогенетические эффекты или изменится способность 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, а также плохом качестве семян (Кузнецова, Машкина, 2011).

Одним из эффектов воздействия тяжелых металлов на семена растений является снижение их всхожести и энергии прорастания (Munzuroglu, Geckil, 2002). Однако в нашем исследовании не было выявлено статистически значимых изменений всхожести или энергии прорастания семян с увеличением концентрации нитрата цинка (рис1).

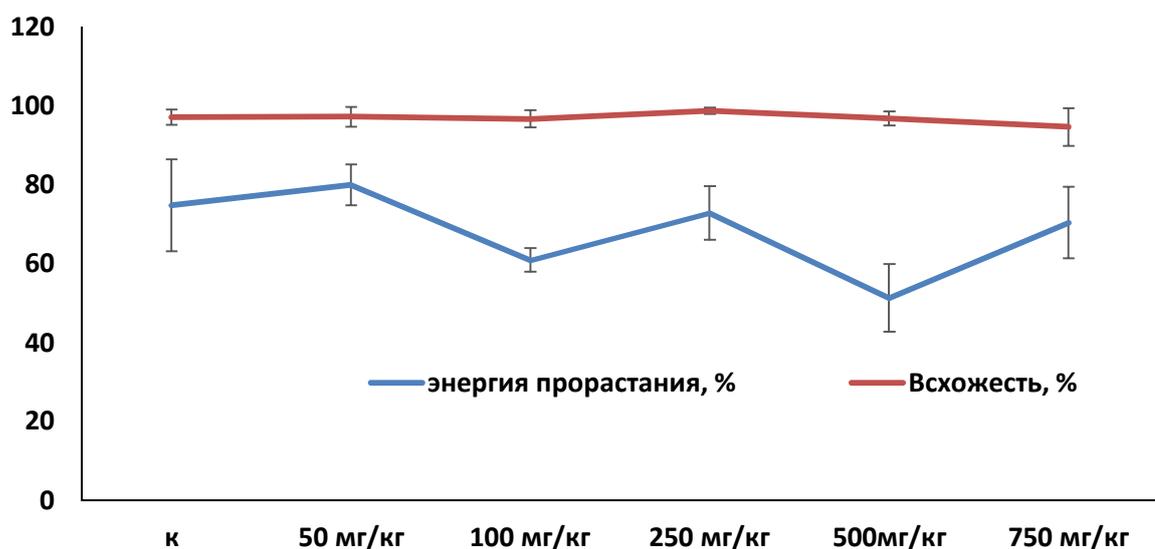


Рисунок 1. Энергия прорастания и всхожесть семян ячменя, выросшего на почвах с разными концентрациями нитрата цинка.

Однако это не означает, что повышенные концентрации цинка в почвах, на которых выращивался ячмень, никак не сказались на качестве его семян. Проведенный анализ митотической активности корневой меристемы проростков семян показал её статистически значимое снижение при концентрациях нитрата цинка в почвах 250 и 750 мг/кг (рис. 2).

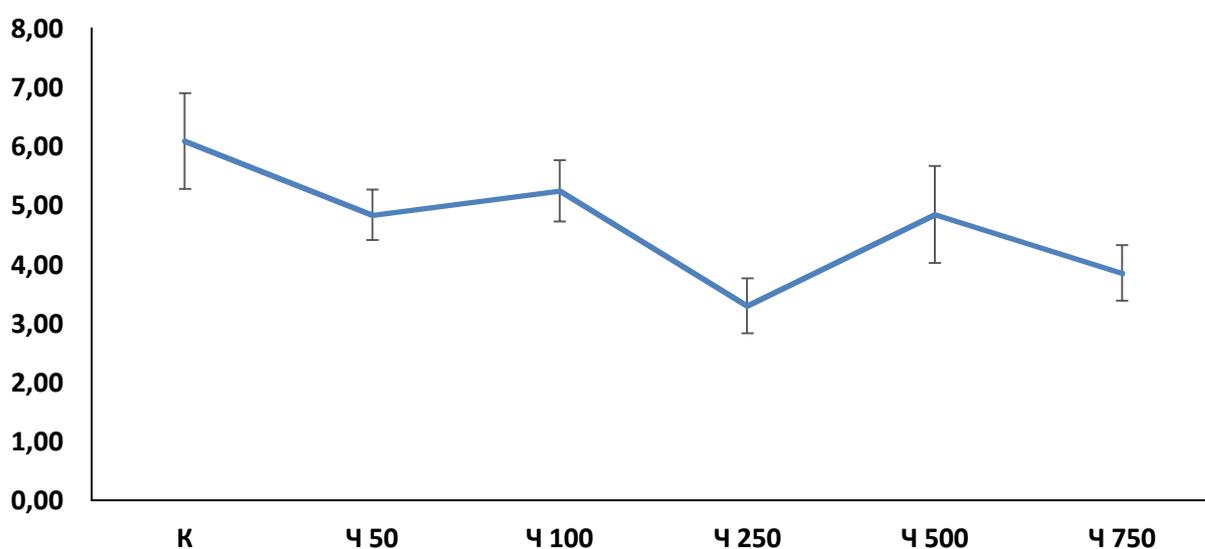


Рисунок 2. Митотическая активность клеток корневой меристемы проростков семян ячменя, выросшего на почвах с разными концентрациями нитрата цинка.

Также и цитогенетический анализ выявил статистически значимый рост числа хромосомных нарушений в клетках корневой меристемы проростков семян при концентрации цинка в почве от 750 мг/кг (табл. 1). Отсутствие эффектов при меньших концентрациях может быть объяснено тем, что цинк хоть 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. Zn принимает участие в углеводном и белковом обмене, окислительных процессах, входит в состав более чем 200 ферментов, участвует в синтезе ДНК, РНК, хлорофилла, оказывает влияние на формирование генеративных органов (Мецлер, 1980). При дефиците Zn прекращается образование семян, наблюдается недостаточное развитие листьев, возникает хлороз. Цинк влияет на проницаемость мембран, стабилизирует клеточные компоненты (Черных и др. 1999). Следовательно, если цинк в определенных концентрациях необходим для растений, то и его генотоксическое действие проявляется только при его содержании в почве, значительно превышающем необходимый для растений уровень.

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 |
| К | 6116 | 0,74±0,06 | 27,78±0,07 | 38,89±0,07 | 33,33±0,07 |
| Ч 50 | 6115 | 0,73±0,05 | 20,83±0,08 | 52,08±0,08 | 27,08±0,05 |
| Ч 100 | 5140 | 0,92±0,10 | 21,67±0,05 | 43,33±0,11 | 35,00±0,09 |
| Ч 250 | 5161 | 0,84±0,10 | 18,64±0,09 | 27,12±0,09 | 54,24±0,09 |
| Ч 500 | 3730 | 0,99±0,12 | 22,45±0,07 | 28,57±0,10 | 48,98±0,08 |
| Ч 750 | 3764 | 1,19±0,13** | 26,23±0,08 | 16,39±0,05 | 57,38±0,10 |

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

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

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

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

Представляет интерес, изменяется ли 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. Проведенный анализ спектра цитогенетических нарушений не выявил статистически значимых изменений спектра цитогенетических нарушений. Следовательно, при изученных концентрациях нитрата цинка в почвах не проявляется специфика его влияния на спектр цитогенетических нарушений.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сказать, что изученные концентрации нитрата цинка не оказали негативного влияния на всхожесть и способность к прорастанию семян ячменя. Однако митотическая активность корневой меристемы семян может статистически значимо снижаться уже при концентрациях нитрата цинка 250 мг на один килограмм почвы. При концентрации нитрата цинка 750 мг

на килограмм почвы статистически значимо увеличивается, по сравнению с контролем, нагруженность клеток корневой меристемы проростков семян цитогенетическими нарушениями.

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.

Мецлер Д. Биохимия. М.: Мир, 1980. Т. 1. 407 с.

Технологические приёмы,обеспечивающие повышение устойчивости агроценозов, восстановление нарушенных земель, оптимизацию ведения земледелия и получение соответствующей нормативам сельскохозяйственной продукции. Под ред Н.И. Санжаровой. – Обнинск: ВНИИСХРАЭ, 2010. 180с.

Черных Н.А., Милащенко Н.З., Ладонин В.Ф. Экотоксикологические аспекты загрязнения почв тяжелыми металлами. М.: Агроконсалт, 1999. 176 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. Diologicalcicles for toxic elements in the invironment // Science 1974. Vol. 183. P. 1049-1059