

СПОСОБНОСТЬ К ПРОРАСТАНИЮ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ У ПРОРОСТКОВ СЕМЯН ЯЧМЕНЯ ВЫРАЩЕННОГО НА ЧЕРНОЗЕМЕ И ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЕ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЦИНКА.

Васильев Д.В.

В результате развития промышленного производства наблюдается значительный рост уровня содержания тяжелых металлов в окружающей среде. В России площадь загрязнения тяжёлыми металлами почв сельскохозяйственных угодий составляет около 3,6 млн. га. (Технологические, 2010). Увеличение содержания в биосфере доступных для живых организмов форм тяжелых металлов делает актуальным изучение их биологического влияния. Особенно важны такие исследования в отношении сельскохозяйственных растений, поскольку общество не способно стабильно развиваться, не будучи обеспеченным 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. 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 изменений ростовых процессов растений и возникновения у них цитогенетических повреждений при воздействии тяжелых металлов необходимо для обоснования решений в природоохранной деятельности и сельском хозяйстве.

В связи с этим нами была проведена оценка качества семенного потомства (всхожесть и энергия прорастания) и частоты цитогенетических эффектов в проростках семян ячменя, выращенного на черноземе и дерново-подзолистой 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 дерново-подзолистые почвы нитрат цинка вносился в концентрациях 25 50 100 150 и 250 мг/кг воздушно-сухой почвы, а в чернозем 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 после посева семян.

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 исключались. 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. Статистическую значимость 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 и 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). В нашем исследовании было установлено, что всхожесть и энергия прорастания семян ячменя, выросшего на дерново-подзолистых почвах, загрязненных нитратом цинка, статистически значимо ниже, чем в контроле при концентрациях более 50 мг/кг воздушно-сухой почвы. При меньшей концентрации - 25 мг/кг наоборот, наблюдалось статистически значимое увеличение всхожести (рис1).

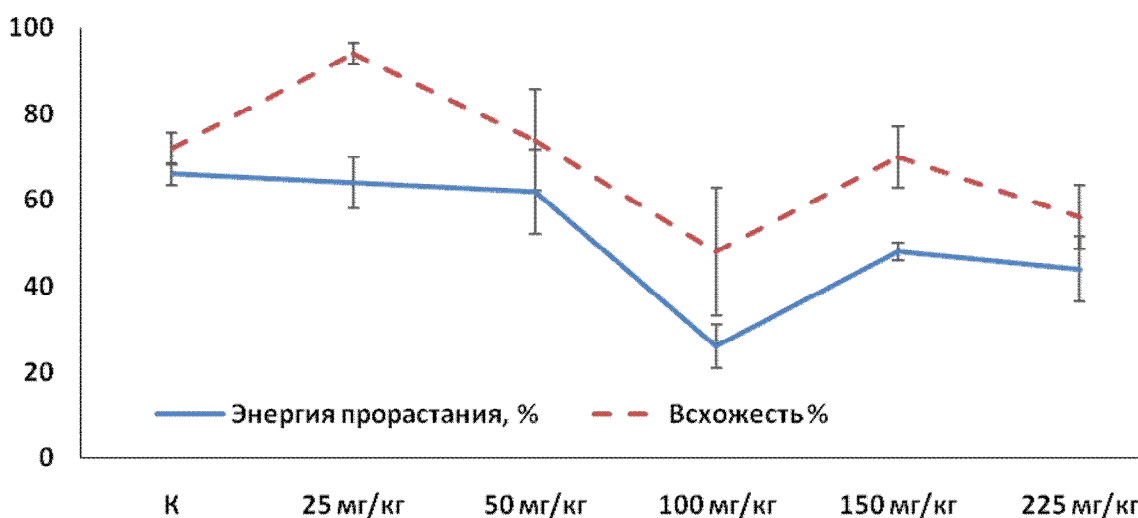


Рисунок 1. Энергия прорастания и всхожесть семян ячменя, выращенного на дерново – подзолистой почве с разными концентрациями нитрата цинка.

У семян ячменя, выросшего на черноземе, несмотря на более высокие концентрации нитрата цинка в почве, статистически значимых изменений всхожести и энергии прорастания обнаружено не было (рис 2).

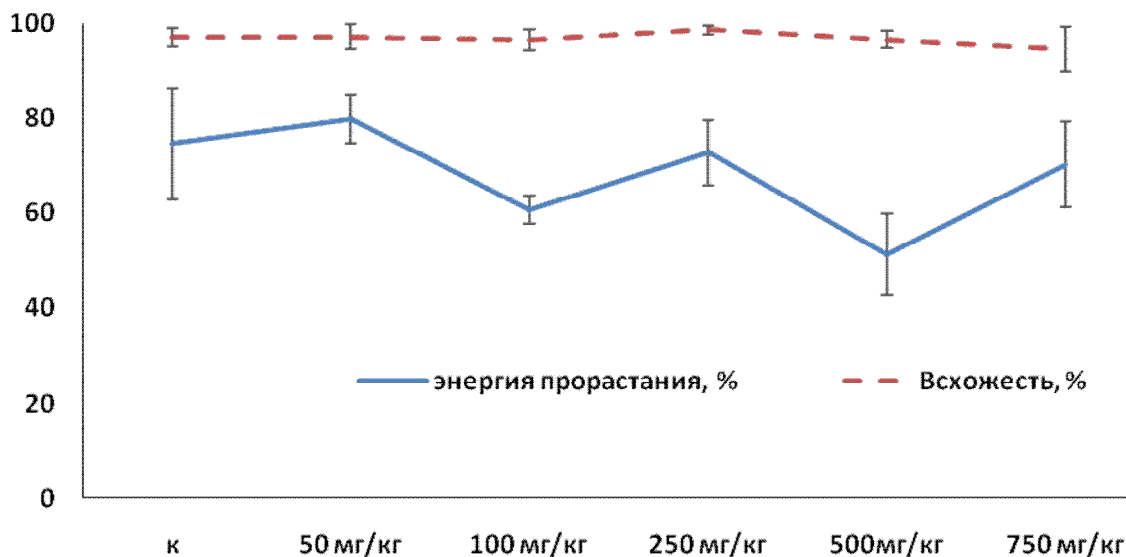


Рисунок 2. Энергия прорастания и всхожесть семян ячменя, выросшего на черноземе с разными концентрациями нитрата цинка.

Однако это не означает, что повышенные концентрации цинка в черноземе никак не сказались на качестве 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. 3).

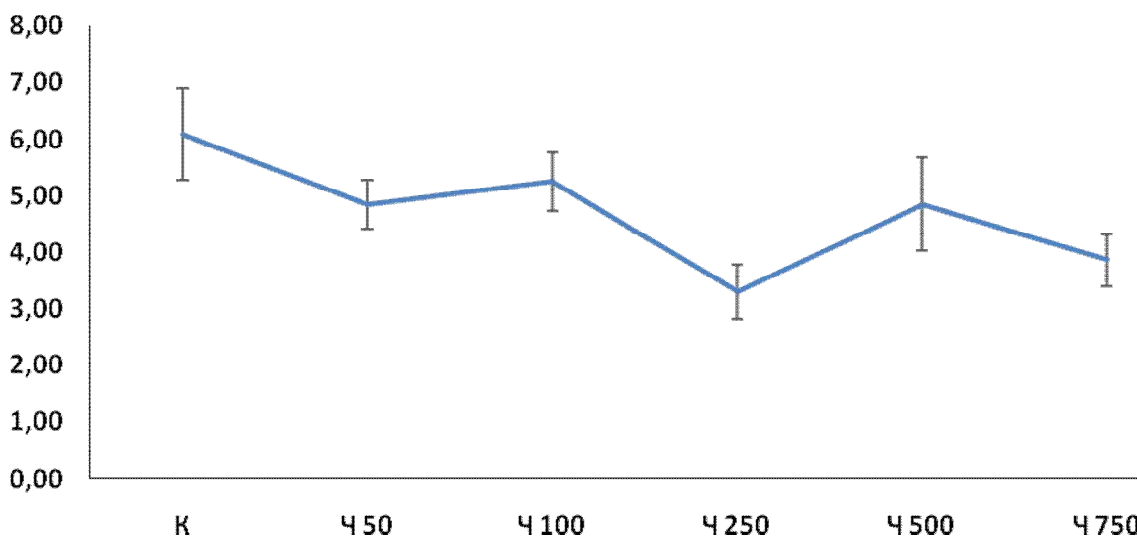


Рисунок 3. Митотическая активность клеток корневой меристемы проростков семян ячменя, выросшего на черноземе с разными концентрациями нитрата цинка.

Цитогенетический анализ выявил статистически значимый рост числа хромосомных нарушений в клетках корневой меристемы проростков семян при концентрации цинка в почве от 100 мг/кг на дерново-подзолистых почвах и от 750 мг/кг на черноземе (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 цинка 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 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 aberrаций, %		
			f'+m'	f''+m''	g+mp
Дерново-подзолистая почва					
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*
Чернозем					
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 – aberrантные 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.

Анализ спектра цитогенетических нарушений выявил рост хроматидных нарушений и незначительное снижение доли хромосомных нарушений с ростом концентрации цинка в дерново-подзолистой почве. Однако достоверные отличия от контроля отмечены лишь при внесении в почву нитрата цинка в концентрации не менее 250 мг/кг. У проростков семян ячменя выращенного на черноземе анализ спектра цитогенетических нарушений не выявил статистически значимых изменений спектра нарушений.

На основании полученных результатов можно сказать, что нитрат цинка способен оказывать влияние на качество семян ячменя и частоту цитогенетических нарушений в их проростках только при достаточно высоких концентрациях в почве. При этом наибольшее влияние на показатели качества семян и цитогенетическую поврежденность их проростков нитрат цинка оказывает на дерново-подзолистых почвах.

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.

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. Biological cycles for toxic elements in the environment // Science 1974. Vol. 183. P. 1049-1059

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.

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 *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus* // 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. Biological cycles for toxic elements in the environment // Science 1974. Vol. 183. P. 1049-1059