

УДК 57;581.1;581.5;615.9

DOI:10.30901/2227-8834-2016-1-52-68

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ В АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЕ КОРЕШКОВ ПРОРОСТКОВ СОРТОВ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.), КОНТРАСТНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К СВИНЦУ

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

Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии,
249020, Россия, г. Обнинск, Киевское шоссе, 109 км,
e-mail: ar.djuna@yandex.ru

Актуальность. Техногенное загрязнение стало значимым фактором дестабилизации природных и аграрных экологических систем. Одним из их опасных загрязнителей является свинец. При этом механизмы его воздействия на растительный организм и пути формирования устойчивости к нему не вполне ясны. **Материалы и методы.** Проростки четырех сортообразцов ярового двурядного ячменя (*Hordeum vulgare* L.), контрастных по устойчивости к свинцу, были подвергнуты цитогенетическому исследованию с целью выявить различия в уровнях митотических нарушений между устойчивыми и чувствительными к ТМ группами сортообразцов. **Результаты и заключение.** Обнаружено, что частоты цитогенетических нарушений в целом и частоты двойных мостов и отставаний хромосом у чувствительных к свинцу сортов были значимо выше, чем у устойчивых даже без наличия поллютанта в среде. Аналогичная закономерность отмечалась для интегральных показателей, характеризующих пролиферативную активность клеток апикальной меристемы – ЧАК, ЧААК, ЧАДК. При этом наиболее существенные различия отмечены для ЧАДК. Сравнение частот встречаемости отдельных фаз митоза не выявило различий между группами сортов. Таким образом, показано, что формирование ответа на действие ТМ предопределяется генетическими характеристиками сортообразцов.

Ключевые слова: проростки, цитогенетические эффекты, апикальная меристема, цитогенетический анализ, контрастные сорта.

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

A. V. Dikarev, V. G. Dikarev, N. S. Dikareva

All-Russian Scientific Research Institute of Radiology and Agroecology,

Kievskoye Shosse, 109 km, Obninsk, Russia, 249020

e-mail: ar.djuna@yandex.ru

DOI:10.30901/2227-8834-2016-1-52-68

Background. Industrial pollution has become a significant factor of natural and agricultural ecosystems' destabilization. Lead is one of the most dangerous pollutants. However, mechanisms of lead influence on plant organism and paths of lead tolerance formation are not completely clear. In this case investigation of causes of lead reaction formation in some agriculture species and cultivars can be useful for plant science.

Materials and methods. Seedlings of 4 lead contrasting spring barley variants (*Hordeum vulgare* L.) were exposed to cytogenetical analysis for discovering differences in mitotic disturbances between HM tolerant and sensitive ones. **Results and conclusion.** Frequencies of mitotic disturbances at all, dual bridges and chromosome laggings in part were significantly higher in lead sensitive variants than tolerant ones even without real action of the pollutant. Similar regularity was found for integral indexes, that is characterizing proliferate activity of apical meristem cells – FAC, FAAC, FADC. Comparison of separate mitotic phase frequencies didn't discover differences between contrasting variants. Thus, predetermination of plants lead influence reactions by its genetical characteristics was proven.

Key words: seedlings, cytogenetical effects, apical meristem, cythogenetic analysis, contrasting variants.

Введение

Техногенное загрязнение стало значимым фактором дестабилизации природных и аграрных экологических систем. Ареалы техногенных выбросов вокруг промышленных предприятий охватывают площадь 18 млн. га, что составляет 1% общей площади Российской Федерации. Например, с выхлопными газами в атмосферу, а затем в почву поступает более 250 тыс. т свинца в год (Nikolaykin et al., 2004). Кроме того, по данным американских исследователей (Eihler, 1993), источниками загрязнения свинцом являются также продукты сжигания твердых отходов (13%), индустрия (11%) и сжигание угля и нефти (3,8%), которые ежегодно рассеивают над континентами около 100 тыс. т свинца. Городская пыль содержит около 1% свинца, в дожде и снеге его до 300 мг/дм³. Ежегодно житель города поглощает около $4,5 \times 10^{-7}$ г свинца. Содержание свинца в крови современного человека в 100 раз превышает его содержание в крови первобытного человека (Nikolaykin et al., 2004). Одним из важных путей поступления тяжелых металлов (ТМ) в организм человека является

употребление в пищу продуктов питания, произведенных на загрязненных сельхозугодьях.

В нашей предшествующей статье (Dikarev et al., 2014a) была проведена работа по определению критической концентрации свинца, вызывающей существенное угнетение ростовых процессов ярового двурядного ячменя – одной из важнейших зерновых культур. С использованием найденной концентрации были проведены испытания 100 сортов этой культуры урожаяв трех лет. Целью работы был выбор комплекса показателей, пригодного для дифференциации указанных сортов по степени их толерантности к воздействию свинца. На основе разработанного критерия было выделено 12 контрастных по реакции на воздействие свинца сортов – по 6 устойчивых и чувствительных.

Полученные данные о достоверной дифференциации изученных сортов по устойчивости к свинцу по морфометрическим и цитогенетическим показателям послужили основой для рабочей гипотезы о возможности прогнозирования устойчивости ячменя по цитогенетическим параметрам апикальных меристем корней проростков без обработки ТМ. Основанием для такой гипотезы явились данные о сильном влиянии солей свинца на цитогенетические параметры меристематических клеток апикальных меристем корней проростков и их связи с уровнем эффектов по их морфометрическим параметрам: длине корешков и ростков, числу всхожих семян и сильным проростков. В связи с этим было логично предположить, что формирование устойчивости на организменном уровне тесно связано с процессами пролиферации клеток меристем, дающих начало всему многообразию различных типов специализированных клеток и тканей, формирующих организм растений и определяющие его основные свойства, в том числе устойчивость к неблагоприятным воздействиям.

В рамках дальнейшего развития исследования было интересно изучить особенности контрастных сортов на интактных образцах. Цитогенетический анализ, использованный в этой работе, имеет ряд преимуществ перед примененным нами ранее методом выявления контрастных по устойчивости сортов с помощью морфологических параметров. Он не требует таких временных и материальных затрат, не столь трудоемок. И выводы об устойчивости можно делать даже без использования ТМ, поскольку, как предполагается, токсическая устойчивость определяется генетическими причинами, и, следовательно, может быть выявлена на интактных образцах.

Основой для таких предположений может быть принята гипотеза о том, что выживаемость растений в условиях стресса на первых этапах онтогенеза в значительной степени связана (Grodzinski, 1983) с сохранением функциональной активности меристематических тканей на цитогенетическом уровне. Для проверки этой гипотезы был проведен эксперимент с интактными растениями ячменя, контрастными по устойчивости к свинцу, в апикальных меристемах прорастающих семян которых было проведено исследование ряда цитогенетических параметров. Конечной целью настоящей работы являлось выяснение возможности отбора сортообразцов ярового двурядного ячменя по устойчивости к свинцу для исследования его генетического полиморфизма по признакам устойчивости без проведения токсикологических исследований и дальнейшего использования их в селекционной работе.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были взяты четыре образца ярового двурядного ячменя (*Hordeum vulgare* L.), контрастные по устойчивости к действию Pb^{2+} , по два устойчивых и чувствительных. Отбор контрастных образцов был выполнен в нашем предыдущем исследовании (Dikarev et al., 2014a) на основе анализа морфологических показателей 100 образцов ячменя урожая 2009 г. Этот выбор был подтвержден в ходе дополнительного исследования семян этих наиболее показательных в плане реакций на действие свинца сортов урожаев 2008 и 2010 гг. При отборе контрастных сортов руководствовались значением коэффициента депрессии (DC):

$$DC = \frac{MV_c - MV_d}{MV_c} * 100\%,$$

где MV_c – значение показателя в контрольном варианте, MV_d – значение показателя при концентрации свинца 1,5 мг/мл. Величину DC рассчитывали для длины ростков, длины корешков, процента сильных и всхожих проростков. Затем все четыре величины суммировали. Если сумма оказывалась меньше 50, сорт признавали устойчивым, если больше 100 – чувствительным. Аналогичный показатель использовался при выделении контрастных по устойчивости к действию ионизирующего излучения сортов пшеницы (Korneev et al., 1985) и при исследовании устойчивости проростков льна разных линий к действию ТМ (Soudek et al., 2010).

На основе полученных данных для исследования пролиферативной активности были взяты по два наиболее показательных сорта: 'Заря', 'Тео', оказавшиеся по приведенному критерию устойчивыми к ТМ, и 'NSGL 1', 'Заветный', признанные чувствительными. Для выполнения цитогенетического анализа семена ячменя проращивали в инкубаторе Sanyo MIR-253 (Япония) с использованием рулонного метода при температуре 24°C (Gost..., 1991). Корни полученных проростков длиной около 10 мм фиксировали в модифицированном фиксаторе Карнуа (смесь 96% этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1). Временные давленные препараты апикальной меристемы корней проростков, окрашивали ацетоорсеином. Препараты анализировали с использованием микроскопа Nikon Eclipse E200 (Япония) при увеличении 40×10. Достоверность полученных результатов обеспечивали путем расчета оптимального объема выборки, дисперсии, стандартной ошибки и отклонения, а также доверительного интервала. Определяли частоту следующих цитогенетических аномалий: мостов, фрагментов, отставаний хромосом и мультиполярных митозов.

Результаты и обсуждение

Общие результаты цитогенетического анализа представлены в таблице. Обращает на себя внимание подавляющее преобладание среди проанализированных делящихся клеток корневых меристем так называемых геномных нарушений – отставаний хромосом. Эти нарушения связаны с повреждением веретена деления, в результате чего нарушается движение хромосом к полюсам дочерних клеток. Конечный итог этого явления – возникновение анеуплоидных клеток и клеток с микроядрами. Нарушений, затрагивающих структуру хромосом (мостов и фрагментов) гораздо меньше. Следует отметить, что одинарные фрагменты в настоящем исследовании вообще не встречались, поэтому они были исключены из дальнейшего рассмотрения, хотя в анализе и учитывались. Аналогичное явление мы наблюдали в клетках меристем корня при действии свинца, которое можно объяснить непосредственным воздействием ионов свинца на элементы структуры веретена деления, например, связыванием его с фосфатными группами белков-ферментов, участвующих в обеспечении движения хромосом к полюсам. Однако в данном исследовании мы наблюдаем образование этих нарушений в интактных клетках и такое объяснение наблюдаемого феномена здесь не подходит.

На рисунке 1 представлены данные о частоте отдельных типов нарушений в спектре, выраженные в долях единицы от всего числа просмотренных делений, которые более точно характеризуют соотношение этих типов с учетом количества последних.

Обращают на себя внимание выраженные достоверные различия между устойчивыми и чувствительными сортами по частоте суммы всех типов нарушений и отставаний. Последние практически и определяют обнаруженную закономерность, так как являются самыми массовыми цитогенетическими аномалиями, наблюдаемыми в данном исследовании. Особенно контрастно выглядят различия между устойчивыми и чувствительными сортами по параметру, представляющему отношения суммы всех типов нарушений к числу всех просмотренных делящихся клеток.

Таблица. Результаты цитогенетического анализа клеток апикальных меристем корня проростков контрастных по устойчивости сортов ячменя
Table. Results of cytogenetical analysis of the root apical meristem cells in seedlings of barley varieties contrasting by their lead resistance

| Сорт Variety | БК NC | АК AC | Число нарушений разных типов Number of different disturbance types | | | | | Всего All |
|----------------------|----------|----------|---|----|-----|----|-----|--------------|
| | | | 1 | m' | m'' | f' | f'' | |
| Заря Zarya | 6774 | 46 | 32 | 2 | 9 | 0 | 6 | 49 |
| Тео Teo | 8355 | 50 | 31 | 9 | 7 | 0 | 6 | 53 |
| NSGL 1 NSGL 1 | 4730 | 49 | 37 | 7 | 19 | 0 | 10 | 73 |
| Заветный Zavetniy | 4960 | 55 | 51 | 5 | 14 | 0 | 6 | 76 |

Примечание. В таблице обозначены типы нарушений: 1 – отставание, m' – мост одинарный, m'' – мост двойной, f' – фрагмент одинарный, f'' – фрагмент двойной. Сокращения: БК – общее число делящихся клеток; АК – число клеток с цитогенетическими нарушениями. NC – number of all cells, AC – aberrant cells.

По результатам цитогенетического анализа частоты цитогенетических нарушений у чувствительных сортов достоверно превосходят таковую у устойчивых (см. рис. 1). Причем наиболее распространенными абберациями оказались отставания и двойные мосты.

Следует отметить, что здесь почти не отмечалось наличия многополюсных митозов. В нашей предыдущей работе, где исследовалось влияние разных доз Pb^{2+} на проростки ячменя, эта аберрация встречалась часто. Вероятно, это можно считать подтверждением того, что свинец вызывает повреждение веретена деления. Поэтому при отсутствии ТМ митотических аномалий такого типа встречается очень мало. По этой причине они не указаны на рисунке 1. Из этого можно сделать вывод, что причиной дифференциации сортов по устойчивости к техногенным токсикантам являются в определенной степени различия в стабильности их хромосомного аппарата. Таким образом, если сорт отличается высокой устойчивостью к ТМ, то выход цитогенетических аномалий невысок, и организм легче переносит негативные воздействия внешней среды. Повышенный уровень цитогенетических нарушений, напротив, приводит к ослаблению организма, что и делает его более подверженным действию негативных факторов среды и такой сорт оказывается более чувствительным к действию свинца.

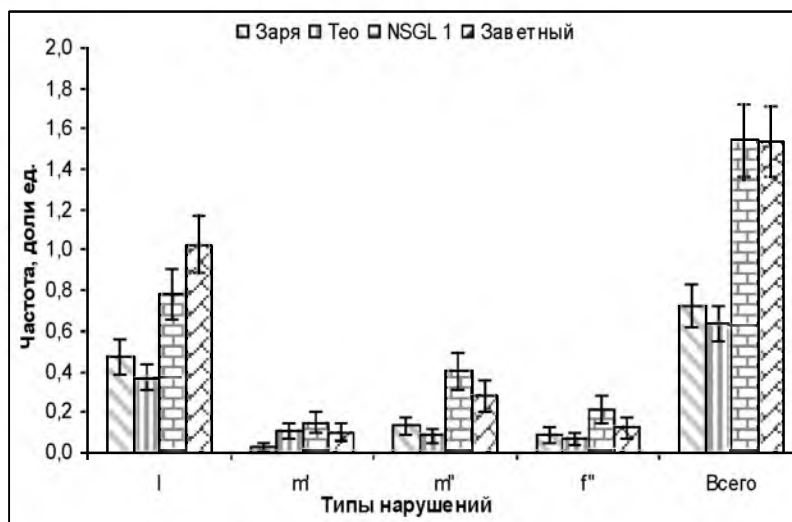


Рис. 1. Спектр цитогенетических нарушений у устойчивых и чувствительных сортов ячменя

Fig. 1. Specter of cytogenetical breaches in tolerant and sensitive barley varieties

Типы нарушений: l – отставание, m' – одинарный мост, m'' – двойной мост, f' – одинарный фрагмент, f'' – двойной фрагмент

Кроме исследования спектра отдельных нарушений был проведен анализ различных соотношений частоты цитогенетических аномалий в

аберрантных клетках и в целом в делящихся клетках для пар устойчивых и контрастных сортов. Для этого были введены следующие интегральные показатели: частота аберрантных клеток (ЧАК), представляющая собой долю аберрантных клеток в процентах от общего количества делящихся клеток; частота aberrаций на делящуюся клетку (ЧАДК) – частота (число) всех типов aberrаций, приходящихся на делящуюся клетку; частота aberrаций на аберрантную клетку (ЧААК) – частота (число) всех типов aberrаций, приходящихся на клетку с aberrациями. Данные показатели были введены для изучения тонких цитогенетических особенностей контрастных сортов, которые могли бы быть использованы для объяснения их различий по устойчивости к действию ТМ. Результаты анализа этих показателей представлены на рисунке 2.

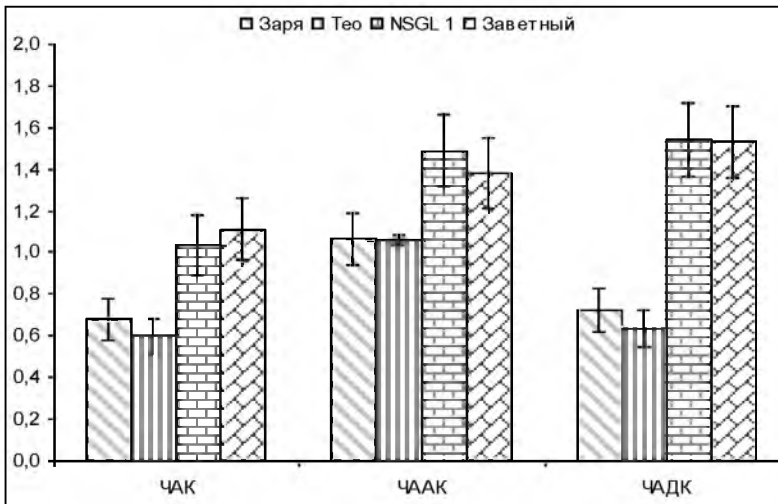


Рис. 2. Различные параметры цитогенетических нарушений в апикальной меристеме корешков проростков контрастных по устойчивости сортов ячменя (объяснения сокращений приведены в тексте)

Fig. 2. Different parameters of cytogenetic disturbances in seedlings' apical meristem of barley varieties contrasting in their lead resistance (abbreviations are explained in text)

Частота аберрантных клеток, наиболее часто используемый показатель в цитогенетическом анализе, в группе чувствительных сортов оказалась достоверно выше, чем у устойчивых сортов. Такие же закономерности наблюдались в группах чувствительных и устойчивых сортов и по двум другим показателям – ЧАДК и ЧААК. Обращает на себя внимание также факт очень близких значений этого показателя в каждой

из групп. Это явление, вероятно, свидетельствует о существовании некоторых общих фундаментальных механизмов, обеспечивающих формирование различий в чувствительности сортов к действию свинца на клеточном уровне и определяющих развитие наблюдаемых особенностей цитогенетических параметров меристематических клеток. Наиболее выраженные различия между группами чувствительных и устойчивых сортов характерны для показателя ЧАДК. Введение этого показателя оказалось весьма продуктивным для разделения сортов на устойчивые и чувствительные (см. рис. 2), хотя интерпретация полученного результата достаточно затруднительна. Возможно, этот феномен объясняется тем, что для проявления устойчивости или чувствительности решающее значение имеет массовость поражения клеток меристем, а не тяжесть поражения ограниченного числа клеток. Следует также учитывать, что самыми массовыми аномалиями являются отставания хромосом, индуцируемые повреждениями веретена деления. Однако частота отставаний не дает столь четкой картины различий между группами сортов по устойчивости, как это происходит в случае использования для анализа суммы всех нарушений. ЧААК часто называют нагруженностью клеток аберрациями (Geras'kin et al., 2005) и в цитогенетике радиационного воздействия используют обычно для оценки эффективности действия различных видов излучения. Биологический смысл этого показателя в случае химического воздействия установить гораздо сложнее по причине наличия существенных различий в механизмах действия химических токсикантов и ионизирующего излучения.

Основываясь на полученных данных, можно сказать, что по всем трем введенным показателям пара чувствительных сортов существенно превосходит устойчивые. Причем наиболее заметна указанная разница по частоте аберраций на делящуюся клетку (ЧАДК). Учитывая эти закономерности, можно сказать, что для чувствительных сортов характерна более высокая частота цитогенетических аномалий, что свидетельствует о большей уязвимости митотического аппарата клеток этих сортов. Можно полагать, что клеточные системы, ответственные за процесс репликации ДНК у чувствительных сортов справляются со своими задачами хуже, чем у устойчивых сортов. Возникновение подобных эффектов может объясняться генетической нестабильностью наследственного аппарата чувствительных сортов. Известно, что такая нестабильность имеет тенденцию возникать у потомков тех индивидов, которые подвергались действию мутагенов разной природы, что и проявляется в повышенной склонности к выходу генетических нарушений (Dubrova, 2010). Помимо подсчета частоты цитогенетических нарушений было проведено сравнение частоты разных фаз митоза и значений

митотического индекса для исследуемых групп сортов. Однако заметных различий между сортами по этим параметрам выявить не удалось (рис. 3).

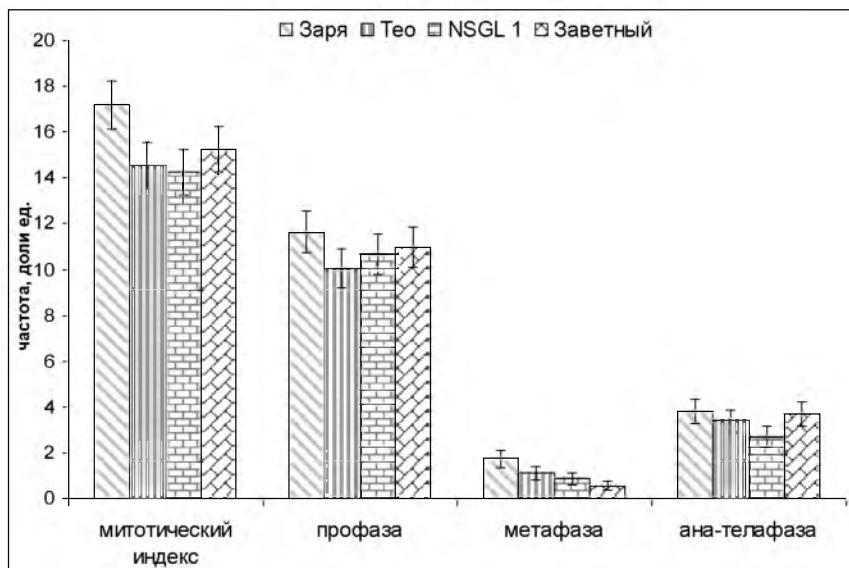


Рис. 3. Митотический индекс и частота фаз митоза в апикальной меристеме ячменя
Fig. 3. Mitotic index and frequencies of mitotic phases in barley's apical meristem

Как известно благодаря работам целого ряда исследователей на разнообразных тест-объектах, ионы тяжелых металлов способны оказывать на живые организмы мутагенное и даже канцерогенное действие (Atabekova, Oustinova, 1971; Pausheva, 1974; Wierzbicka, 1988a, b; Dikarev et al., 2014b). Одним из значимых механизмов стрессового воздействия ТМ на клетку является стимуляция повышенной выработки активных форм кислорода (АФК) (Seregin, Ivanov, 2001; Poleskaya, 2007). Как следствие, повышенные концентрации АФК вызывают в клетке многообразные повреждения во всех процессах ее функционирования в нативной структуре ферментов, что и приводит в конечном счете к возникновению разного рода нарушений в клетке. Помимо того, ионы ТМ сами могут оказывать токсическое действие на метаболизм клетки, например, за счет отравления активных центров ферментов или искажения конформаций молекул и, соответственно, снижения их активности. Это приводит к нарушению процессов фотосинтеза, дыхания, энергетических и регуляторных процессов (Gural'chuk, 1994; Fenik et al., 1995). Отдельные

ТМ способны взаимодействовать с ДНК, изменяя ее структуру. Так, ион Pb^{2+} имеет валентный полностью заполненный 5d подуровень, что открывает ему возможности для образования донорно-акцепторной связи с вакантными орбиталями фосфорных остатков нуклеиновых кислот, а также амино- и карбоксильными группами (Richmayr-Lais, Kurchgessner, 1984). Возможно связывание свинца и с сульфогруппами аминокислот, тогда оно способно разрывать дисульфидные мостики, удерживающие вторичную структуру белков, и переводить их в денатурированное состояние. Подобные процессы могут приводить к образованию сшивок ДНК и белка и к разрыву нитей нуклеиновых кислот. В результате возникают нарушения процессов транскрипции, трансляции и репликации, и других процессов. Кроме того, в механизмах клеточного деления важную роль играют процессы фосфорилирования белков, участвующих в функционировании митотического веретена, которые также могут нарушаться при связывании фосфатных групп с ионами свинца.

Чтобы обеспечить максимально возможный уровень эффективности обнаружения мутагенности ТМ, важно правильно определить объект, методику исследования и генетической тест-системы. Например, подобные явления с трудом выявляются в работах с микроорганизмами. В случае если используются растения или животные, данные могут быть противоречивы. Например, в работах (Reutova, Shevchenko, 1991, 1992; Reutova, 1993), выполненных на сое, скерде и традесканции, при всех исследованных концентрациях Pb^{2+} , в отличие от приведенных в настоящей работе данных, не обнаружено роста частоты цитогенетических нарушений. Однако полученные нами данные вполне согласуются с представленными в работах на скерде (Ruposhev, 1976) и (Dineva et al., 1993) на арабидопсисе. В этих источниках отмечались достоверные статистические различия в частотах цитогенетических нарушений между контрольными и опытными вариантами.

Помимо указанного, высказывалось мнение (Hartwig et al., 1990), что ТМ и, в частности, свинец, могут воздействовать на системы репарации клетки. Считается, что осуществляющие данные процессы нуклеазы связываются с ДНК электростатическим образом (Dodson, Lloyd, 1989). Особенности работы этого механизма зависят от ионной силы цитоплазмы: в случае, если активность ионов низка, то электростатически связанные с ДНК ферменты относительно быстро диффундируют к нужному месту за счет линейной диффузии (процессивный механизм). Если же активность увеличивается, то Ван-дер-Ваальсовы силы уменьшаются, и молекула энзима мигрирует к поврежденному участку уже из объема (распределительный механизм), в итоге кинетика процесса нарушается. Таким образом, реализация процесса репарации находится в зависимости

от активности катионов во внутриклеточном соке, в том числе и тяжелых металлов. Та же работа сообщает, что здесь значимым является именно ионная сила частицы и связанная с ней осмомолярность среды. При высокой концентрации ионов усиливается ориентационное взаимодействие ДНК и белков (особенно гистона H1), что затрудняет протекание первого из рассмотренных механизмов, хотя если нуклеиновая кислота свободна от белка, то линейная диффузия вдоль нее должна протекать легко. При высокой ионной силе раствора такой же эффект должен достигаться за счет конденсации хроматина при повышенной активности ионов (это явление известно как «высаливание белков»). Сбалансированности данного процесса и оптимальной работы механизмов репарации удастся достичь лишь при значениях ионной силы, близких к естественным. Из всего сказанного можно сделать вывод, что тяжелые металлы, способные воздействовать на процесс репарации описанным образом, следует отнести к группе веществ, называемых «псевдомутагенами», то есть такими, которые сами непосредственно не производят модификации нуклеиновых кислот, но за счет ухудшения эффективности репарации косвенно способствуют повышению выхода генетических нарушений (Gaziev et al., 1987; Luchnik et al., 1993). За счет этого свинец, как и другие ДНК-тропные агенты, может вызывать возникновение синергических эффектов. Вероятно, у чувствительных к действию ТМ сортов ячменя эти процессы происходят более активно, что и объясняет их повышенную реакцию на стрессор. С другой стороны, эти сорта могут более активно поглощать ионы ТМ (Baker, 1987), так что в цитоплазме их оказывается больше, ввиду чего процессы репарации повреждений у них тормозятся сильнее. Еще одной причиной, которая может вызвать дифференциацию сортов по устойчивости, возможно, является различная устойчивость самих ферментов, ответственных за репарацию повреждений.

Еще одной существенной особенностью тяжелых металлов является их специфика взаимодействия с мишенью и пути их поступления к ней. Ионизирующее излучение, достигнув клетки, может быть ослаблено окружающими тканями, однако сохраняет изначальные свойства. Оно не изменяется в процессе взаимодействия с организмом. В то же время тяжелые металлы, как и другие химические реагенты, не являются биологически инертными. Они, попав в организм, вовлекаются в сложные пути метаболизма. В процессе этого происходит их непредсказуемое изменение. В итоге возможно образование соединений, которые могут быть нетоксичными (например, ионы ТМ окажутся прочно связанными в практически нерастворимом соединении), а могут, наоборот, образовать более токсичные продукты (металлорганические или другие соединения).

Усложняет ситуацию еще и то, что многие ТМ являются биологически важными микроэлементами, необходимыми для нормального протекания тех или иных жизненных процессов. Ввиду этого они могут энергично поглощаться живым существом, однако в избыточных концентрациях вместо стимуляции жизнедеятельности будут ее угнетать. Ряд ТМ по этой причине не встречают барьеров на пути своего поступления в растения и способны накапливаться в больших количествах в тканях, образуя кристаллические включения. Хотя свинец не считается микроэлементом, подобные образования наблюдались в нашем исследовании (Dikarev et al., 2014a) и работах других авторов (Wierzbicka, 1987a, b; Antosiewicz, Wierzbicka, 1999; Kopittke, 2007). Однако возникновение таких соединений также может являться итогом стремления растительной клетки исключить опасные ионы из метаболизма путем перевода их в нерастворимое состояние, как это происходит у многих растений с избыточными количествами других катионов, например, кальция.

Заключение

По результатам исследования митотической активности и спектра цитогенетических нарушений, наблюдаемых в клетках апикальной меристемы корешков проростков сортов ярового ячменя, контрастных по устойчивости к свинцу, удалось обнаружить следующие эффекты. Показано, что для устойчивых сортов характерна более низкая частота хромосомных aberrаций в клетках апикальной меристемы корня, чем у чувствительных. Наиболее распространенным типом нарушений являются отставания, на их примере ярче всего проявляются различия между контрастными сортами. Вероятно, это связано с меньшей устойчивостью аппарата веретена деления у чувствительных сортов. Второй по распространенности aberrацией оказались двойные мосты, по которым также отмечена заметная разница между парами контрастных сортов. Возможно, это также связано с особенностями функционирования веретена деления. По частотам наблюдавшихся также одинарных мостов и двойных фрагментов значимых отличий выявить не удалось. Подобные нарушения связаны с разрывами ДНК, вызываемыми действием ионизирующего излучения. В данном случае клетки не подвергались влиянию подобных агентов, и по этой причине, видимо, различий в данном случае выявить не удалось. Таким образом, можно сделать вывод, что чувствительные к действию свинца сорта ячменя показывают больший выход цитогенетических аномалий, чем устойчивые. При этом отмечаемые нарушения главным образом связаны со сбоями в работе аппарата веретена деления. Помимо того, исследованы интегральные цитогенетические

показатели для групп контрастных сортов (ЧАК, ЧАДК, ЧААК). По всем 3-м показателям чувствительные сорта превосходили устойчивые, при этом наиболее ярко различия проявлялись по ЧАДК. Это свидетельствует о большей уязвимости хромосомного аппарата чувствительных сортов, вызванного, возможно, его наследственной нестабильностью. ЧАДК в данном случае оказывается наиболее информативным показателем, хотя его интерпретация может оказаться несколько затруднительной. Возможно, различия наиболее заметны при сопоставлении частоты aberrаций с общей массой делящихся клеток, чем с когортой тех из них, что уже несут те или иные нарушения. При сопоставлении частот разных фаз митоза и митотического индекса для групп контрастных сортов значимых различий выявить не удалось. Таким образом, можно утверждать, что формирование внутривидового полиморфизма ячменя по устойчивости к свинцу на организменном уровне в известной степени определяется цитогенетическими особенностями растительного организма. Это дало бы возможность с помощью скрининга коллекции сортообразцов с использованием цитогенетических параметров апикальных меристем корешков проростков выявить среди них контрастные по устойчивости на интактном материале. Естественно, что для серьезных выводов о надежности предлагаемого подхода к отбору сортообразцов по устойчивости к свинцу необходимы дальнейшие исследования на более представительном материале, однако полученные результаты вселяют надежду на определенную вероятность успеха данного направления.

References/Литература

- Antosiewicz D., Wierzbicka M.*, Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy // Journal of Microscopy, 1999, vol. 195, pp. 139–146.
- Atabekova A. I., Oustinova E. I.* Cytology of plants (Citologiya rastenii). 1971, 256 p. [in Russian] (*Атабекова А. И., Устинова Е. И.* Цитология растений. 1971. 256 с.).
- Baker A. J. M.* Metal tolerance. New phytologist, 1987, vol. 106, pp. 93–111.
- Dikarev A. V., Dikarev V. G., Dikareva N. S.* Effect of lead nitrate on the morphological and cytogenetic parameters of spring two-row barley (*Hordeum vulgare* L.) // Agrokhimiya – Agrochemistry, 2014a, no 7, pp. 59–66 [in Russian] (*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. 2014а. № 7. С. 59–66).
- Dikarev A. V., Dikarev V. G., Dikareva N. S., Geras 'kin S. A.* Analysis of spring barley intraspecific polymorphism in connection with tolerance to lead //

- Sel'skohozyaistvennaya biologiya – Agricultural biology, 2014b, no 5, pp. 78–87 [in Russian] (Дикарев А. В., Дикарев В. Г., Дикарева Н. С., Гераськин С. А. Анализ внутривидового полиморфизма ярового ячменя по устойчивости к действию свинца // Сельскохозяйственная биология. 2014b. № 5. С. 78–87).
- Dineva S. B., Abramov V. I., Shevchenko V. A. Genetic consequences of lead nitrate influence at seeds of chronic irradiated *Arabidopsis thaliana* populations (Geneticheskie posledstviya deistviya nitrata svinca na semena hronicheski obluchaemykh populyacii *Arabidopsis thaliana*) // Genetika – Genetics, 1993, vol. 29, no 11, pp. 1914–1919 [in Russian] (Динева С. Б., Абрамов В. И., Шевченко В. А. Генетические последствия действия нитрата свинца на семена хронически облучаемых популяций *Arabidopsis thaliana* // Генетика. 1993. Т. 29. № 11. С. 1914–1919).
- Dodson M. L., Lloyd R. S. Structure-function studies of the T4 endonuclease V repair enzyme. Mutation Research, 1989, vol. 218, pp. 49–65.
- Dubrova Yu. E. Like father like son: transgenerational genomic instability in mammals. Materials of 3rd International conference, dedicated to N. W. Timofeeff-Resovsky «Modern problems of genetics, radioecology and evolution», Alushta, Crimea, 9–14 october 2010: Abstr., Papers by young scientists. Dubna, 2010, p. 234.
- Eihler V. Poisons in our food (Yady v nashei pische). Moscow, 1993, 189 p. [in Russian] (Эйхлер В. Яды в нашей пище. М., 1993. 189 с.).
- Fenik S. I., Trofimyak T. B., Blyum Ya. B. Mechanisms of forming resistance of plants to heavy metals // Uspehi sovremennoi biologii – Successes of modern biology, 1995, vol. 115, no 3, pp. 261–276 [in Russian] (Феник С. И., Трофимьяк Т. Б., Блюм Я. Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжелым металлам // Успехи современной биологии. 1995. Т. 115. Вып. 3. С. 261–276).
- Gaziev A. I., Zhestyanyikov V. D., Konoplyanikov A. G. Discovering and investigation of cell repair appearance and its genetic structure after ionizing radiation induced breaches (Otkrytie i izuchenie yavleniya vosstanovleniya kletok i ih geneticheskikh struktur ot povrejdenii, vyzyvaemykh ioniziruyuschei radiaciei). Puschino, 1987, 40 p. [in Russian] (Газиев А. И., Жестяников В. Д., Конопляников А. Г. Открытие и изучение явления восстановления клеток и их генетических структур от повреждений, вызываемых ионизирующей радиацией. Пушино, 1987. 40 с.).
- Geras'kin S. A., Kim J. K., Dikarev V. G. Cytogenetic effects of combined radioactive (¹³⁷Cs) and chemical (Cd, Pb and 2,4-D herbicide) contamination on spring barley intercalary meristem cells // Mutation Research, 2005, no 586, pp. 147–159.
- GOST 12038-84. Seeds of agricultural plants. Methods of germination estimation (Semena sel'skohozyaistvennykh kul'tur. Metody opredeleniya vshojesti) Moscow, 2010, 25 p. [in Russian] (ГОСТ 12038-84. Семена

- сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. М., 2010. 25 с.)
- Grodzinski D. M. Radiobiology of plants (Radiobiologiya rastenii). Moscow, 1983, 467 p. [in Russian] (Гродзинский Д. М. Радиобиология растений. М., 1983. 467 с.)
- Gural'chuk Zh. Z. Mechanisms of plants tolerance to heavy metals influence (Mehanizmy ustoichivosti rastenii k deistviyu tyazelyh metallov) // Fiziologiya i biohimiya kul'turnyh rastenii – Physiology and biochemistry of culture plants, 1994, vol. 26, no 2, pp. 107–117 [in Russian] (Гуральчук Ж. З. Механизмы устойчивости растений к действию тяжелых металлов // Физиология и биохимия культурных растений. 1994. Т. 26. № 2. С. 107–117.)
- Hartwig A., Schleppegrell R., Beyersmann D. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammal cells // Mutation Research, 1990, vol. 241, no 1, pp. 75–82.
- Kopittke P. M Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna inguiculata*). Environmental pollution, 2007, vol. 150, pp. 280–287.
- Korneev N A., Sarapul'tzev B. I., Morgunova E. A. Intraspecific radioresistance polymorphism of seeds of hexaploid wheat (Vnutrividovoi polimorfizm radiorezistentnosti semyan geksaploidnoi pshenicy) // Radiobiologiya – Radiobiology, 1985, vol. 25, no 6, pp. 768–773. [in Russian] (Корнеев Н. А., Сарapultzev Б. И., Моргунова Е. А. Внутривидовой полиморфизм радиорезистентности семян гексаплоидной пшеницы // Радиобиология. 1985. Т. 25. № 6. С. 768–773) .
- Luchnik N. V., Poryadkova N. V., Kondrashova T. V. Appearance of pseudomutagenesis by spontaneous and radiation mutagenesis (Yavlenie psevdmutageneza pri spontannom i radiacionnom mutageneze). Radiobiologicheskii s'ezd – Radiobiology congress, Puschino, 1993, no 2, pp. 615–616 [in Russian] (Лучник Н. В., Порядкова Н. А., Кондрашова Т. В. Явление псевдомутагенеза при спонтанном и радиационном мутагенезе. Радиобиологический съезд. Пушино, 1993. № 2. С. 615–616).
- Nikolaykin N I., Nikolaykina N. E., Melekhova O. P. Ecology (Ekologiya), Moscow., 2004, 622 p. [in Russian] (Николайкин Н. И., Николайкина Н. Е., Мелехова О. П. Экология. М., 2004. 622 с.).
- Pausheva Z. P. Practical works on plants cytology (Praktikum po citologii rastenii), Moscow, 1974, 288 p. [in Russian] (Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М., 1974. 288 с.)
- Polesskaya O. G. Plant cell and reactive oxygen forms (Rastitel'naya kletka i aktivnye formy kisloroda), Moscow, 2007, 185 p. [in Russian] (Полесская О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М., 2007. 185 с.)
- Reutova N. V., Shevchenko V. A. About mutagenic influence of two different lead compounds (O mutagennom vliyani dvuh razlichnyh soedinenii svinca) // Genetika – Genetics, 1991, vol. 27, no 7, pp. 1275–1279 [in Russian] (Реутова Н. В., Шевченко В. А. О мутагенном влиянии двух различных соединений свинца // Генетика. 1991. Т. 27. № 7. С. 1275–1279).

- Reutova N. V., Shevchenko V. A.* Mutagenic influence of lead and silver inorganic compounds on tradescantia (Mutagennoe deistvie neorganicheskikh soedinenii serebra i svinca na tradeskanciю) // *Genetika – Genetics*, 1992, vol. 28, no 9, pp. 89–96 [in Russian] (*Реутова Н. В., Шевченко В. А.* Мутагенное действие неорганических соединений серебра и свинца на традесканцию // *Генетика*. 1992. Т. 28. № 9. С. 89–96.)
- Reutova N. V., Shevchenko V. A.* Mutagenic influence of lead and silver iodides and nitrates (Mutagennoe vliyanie iodidov i nitratov serebra i svinca) // *Genetika – Genetics*, 1993, vol. 29, no 6, pp. 928–934 [in Russian] (*Реутова Н. В.* Мутагенное влияние йодидов и нитратов серебра и свинца // *Генетика*. 1993. Т. 29. № 6. С. 928–934).
- Richmayr-Lais A. M., Kurchgessner M.* Lead. Biochemistry of the essential ultratrace elements. N.Y., 1984, pp. 367–387.
- Ruposhev A. R.* Cytogenetic effect of heavy metal ions on seeds *Crepis capillaries* L. (Citogeneticheskii effekt ionov tyazelykh metallov na semena *Crepis capillaries* L.) // *Genetika – Genetics*, 1976, vol. 12, no 3, pp. 37–43 [in Russian] (*Рупосhev А. Р.* Цитогенетический эффект ионов тяжелых металлов на семена *Crepis capillaries* L. // *Генетика*. 1976. Т. 12. № 3. С. 37–43).
- Seregin I. V., Ivanov V. B.* Physiological aspects of cadmium and lead toxic influence on higher plants (Fiziologicheskie aspekty toksicheskogo deistviya kadmiya i svinca na vysshie rasteniya) // *Fiziologiya rastenii – Physiology of plants*, 2001, vol. 48, no 4, pp. 606–630 [in Russian] (*Серегин И. В., Иванов В. Б.* Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // *Физиология растений*. 2001. Т. 48. № 4. С. 606–630).
- Soudek P., Katrusakova A., Sedlacek L.* Effect of heavy metals on inhibition of root elongation in 23 cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Archives Environmental Contamination Toxicology*, 2010, vol. 59, pp. 194–203.
- Wierzbicka M.* Lead translocation and localization in *Allium cepa* roots // *Canadian Journal of Botany*, 1987a, vol. 65, pp. 1851–1860.
- Wierzbicka M.* Lead accumulation and its translocation barriers in roots of *Allium cepa* autoradiographic and ultrastructural studies // *Plant cell environment*, 1987b, vol. 10, pp. 17–26.