
М.В. Белоусов, О.С. Машкина, Е.Ю. Пардаева, Е.А. Зеленина, В.Н. Попов

ВЛИЯНИЕ СВИНЦА И ВЫБРОСОВ АВТОТРАНСПОРТА НА СОСНУ ОБЫКНОВЕННУЮ (*PINUS SYLVESTRIS L.*) ПО ДАННЫМ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

М. V. Belousov, O. S. Mashkina, Y. Y. Pardayeva, Y. A. Zelenina, V. N. Popov

LEAD AND VEHICLE EMISSIONS EFFECT ON SCOTS PINE (*PINUS SYLVESTRIS L.*) ACCORDING TO CYTOGENETIC ANALYSIS

*Выявлено существенное изменение цитогенетических показателей у потомства деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris L.*), произрастающих вдоль оживленной автомагистрали Воронеж-Дон (подвергающихся хроническому воздействию выхлопных газов автотранспорта), а также при действии различных концентраций нитрата свинца.*

Ключевые слова: сосна обыкновенная, выбросы автотранспорта, свинец, цитогенетический полиморфизм.

*A significant change in cytogenetic parameters of the Scots pine trees (*Pinus sylvestris L.*) progeny, growing along a busy highway Voronezh-Don (chronically exposed road transport emissions), as well as the effect of different concentrations of lead nitrate has been studied.*

Keywords: Scots pine, vehicles emissions, lead, cytogenetic polymorphism.

Введение

В настоящее время ведущая роль в загрязнении воздушной среды городов обусловлена выбросами автотранспорта [Снежко, 2011]. Вклад автомобильного транспорта в загрязнение атмосферного воздуха г. Воронежа составляет 80-90 % от всех выбросов (более 430 тыс. т. в год). Выбросы промышленных предприятий за последние 25 лет снизились со 160 тыс. т. в 1985 г. до 58 тыс. т. в 2010 г., что обусловлено остановкой производства на многих предприятиях [Джувеликян, 1999].

Целью работы явилось изучение изменчивости цитогенетических показателей семенного потомства сосны обыкновенной в ответ на выбросы автотранспорта (сложную смесь, состоящую из более чем 280 компонентов), создающих основной фон загрязнения окружающей среды крупных городов, а также на воздействие свинца (как одного из опасных генотоксичных загрязнителей, входящих в состав выхлопов автотранспорта).

Реакция растений, в т.ч. лесных древесных, на факторы среды изучена далеко не полностью [Титов, 2007]. Влияние тяжелых металлов (ТМ) на живые организмы в последнее время активно изучается на морфофизиологическом и биохимическом уровнях [Серегин, 2001; Титов, 2007]. Практически отсутствуют экспериментальные работы, направленные на изучение действия конкретных металлов на важнейшие цитогенетические показатели хвойных растений [Fedorkov, 2007]. В то же время цитогенетические методы позволяют проследить изменения генетической системы, об-

условленные стрессовым воздействием, на ранних стадиях их возникновения (еще до момента фенотипического проявления) [Буторина, 2007].

Сосна обыкновенная является одним из основных видов-лесообразователей на территории России (в том числе и Воронежской области), удобным и чувствительным тест-объектом в мониторинговых исследованиях, имеет важное природоохранное значение. Проведение подобных исследований необходимо для биомониторинга загрязнения окружающей среды, выявления механизмов действия различных по природе стрессовых факторов на клеточном уровне и возможных путей адаптации к ним, отбора устойчивых деревьев для целей лесовосстановления на антропогенно загрязненных территориях.

Материал и методы

Контроль. Объектами исследования служили семена деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) из Усманского бора (территория Воронежского государственного биосферного заповедника (ВБГЗ), квартал 80, выдел 22), рассматриваемого по данным цитогенетического анализа как эталон экологической безопасной территории [Буторина, 2007]. По типу лесорастительных условий – сухой бор (A_1); состав – 100 % сосна обыкновенная. Усманский бор – это вторичный лес, расположенный вдоль водоразделов рек Воронеж и Усмань (Воронежская область, Россия). Количество ТМ в почве находится в пределах нормы [Протасова, 2011].

Первый этап исследования. Для оценки последствий длительного (хронического) действия стрессорных факторов антропогенного происхождения семена сосны были заготовлены с материнских деревьев из естественного насаждения вдоль оживленной автомагистрали Воронеж – Дон (Московское шоссе), подвергающихся хроническому воздействию выхлопных газов автотранспорта. Семенной материал (F_1 поколение) для исследований заготавливали в течение 6-ти лет (2005-2010 гг.) с 10 фенотипически нормальных деревьев. Преобладающими загрязнителями в данном районе были свинец, бенз(а)пирен, оксид углерода, окислы азота, углеводороды, окислы серы, бензол, формальдегид, окислы тяжелых металлов и другие составляющие выбросов автотранспорта. Предельно допустимые концентрации углерода оксида от выбросов автотранспорта здесь повышаются до 7 ПДК [Доклад..., 2010].

Второй этап исследования. В опытных вариантах семена предварительно замачивали в растворах нитрата свинца $Pb(NO_3)_2$ разной концентрации (от 0,5 до 2000 мкМ, что соответствует примерно от 3,5 до 14 000 ПДК) в течение 18 часов. Затем проращивали на этих же растворах в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 25 °С (5-7 дней). Контролем служили семена, замоченные и пророщенные в дистиллированной воде при той же экспозиции.

Проростки из контрольного и опытного вариантов (достигшие длины 5-15 мм) фиксировали в 9 и 19 часов (в пик митотической активности для *Pinus sylvestris* L.) в спиртово-уксусной смеси (3 части 96 % этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты). Препараты для цитогенетического анализа, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по описанной ранее методике [Буторина, 2007]. Для каждой выборки просматривали более 20 давленных микропрепаратов (1 корешок – 1 препарат),

на которых анализировали не менее 1000 клеток. Микрофотосъемку осуществляли с использованием насадки DCM500 (USB 2.0; WEBBERS MYscope 500 M).

Нами анализировались следующие показатели:

- 1) митотическая активность меристематической ткани (которая определялась по митотическому индексу – МИ), устанавливаемая отношением числа делящихся клеток на стадиях про-, мета-, ана- и телофазы к общему числу просмотренных клеток в %;
- 2) число клеток на каждой стадии митоза (в %) для определения их продолжительности;
- 3) общее число патологий митоза (ПМ) и наиболее характерные типы митотических нарушений (отношение числа клеток с нарушениями митоза на стадиях мета-, ана- и телофазы к общему числу делящихся клеток в %, спектр ПМ представлен процентными долями от общего числа нарушений);
- 4) доля клеток с микроядрами (процентное отношение клеток с микроядрами к общему числу интерфазных клеток);
- 5) доля клеток с n количеством ядрышек в интерфазных клетках (из расчета на 500-600 клеток на препарат).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ «Stadia» и «Statistica».

1. Влияние выбросов автотранспорта на цитогенетические показатели сосны обыкновенной

Установлено, что у потомства деревьев сосны, произрастающих вдоль оживленной автомагистрали Воронеж-Дон и подвергающихся хроническому воздействию выхлопных газов автотранспорта (предельно допустимые концентрации углерода оксида от выбросов автотранспорта здесь повышаются до 7 ПДК [Доклад..., 2010]), существенно изменяются цитогенетические показатели. Возрастают частота и спектр патологий митоза (ПМ), уровень встречаемости микроядер, происходит ингибирование митотической активности по сравнению с контролем, взятым из Усманского бора (территория Воронежского государственного биосферного заповедника). Так, средняя частота ПМ за 6 лет (2005-2010 гг.) мониторинговых исследований составила $5,1 \pm 0,3$ %, что находится на границе пределов нормальных значений уровня спонтанного мутирования в средней полосе России – до 5 % [Буторина, 2007] и в 4 раза выше по сравнению с экологически благоприятной территорией ($1,2 \pm 0,3$ %). В потомстве деревьев отмечен широкий спектр ПМ: 14 типов, против 5 в контроле (рис. 1). В районе автомагистрали отмечается преобладание в общем спектре структурных нарушений (перестроек) хромосом (в сумме составляющих 67 %, против 21 % в контроле): фрагменты хромосом в метафазе и анафазе (1 тип), мосты в анафазе и телофазе (6 и 12 тип) и кольцевые хромосомы в метафазе и анафазе (14 тип), свидетельствующие о повышении уровня мутационного процесса. Здесь же выявлены нежизнеспособные нарушения, отсутствующие в контроле: агглютинация хромосом в метафазе и анафазе, единичные случаи кариомиксиса и амитозоподобных делений. Доля микроядер (являющихся показателем нерепарированных повреждений хромосом) повышается в 20 раз по сравнению с контролем ($0,01 \pm 0,004$ % и $0,2 \pm 0,02$ % соответственно).

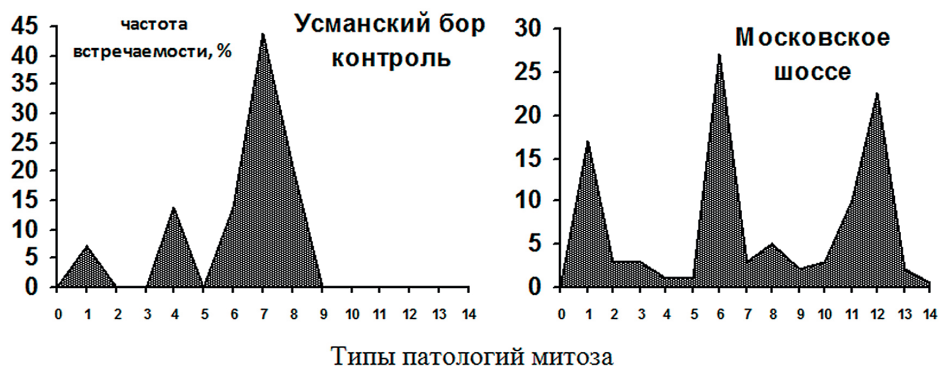


Рис. 1. Спектр патологий митоза в потомстве деревьев сосны обыкновенной из разных по степени загрязнения мест произрастания.

Типы патологий митоза: 1 – фрагменты хромосом в метафазе; 2 – расщепление веретена (метафазной пластинки); 3 и 11 – аглютинация хромосом в метафазе (3) и анафазе (11); 4 и 8 – отставание хромосом в метакинезе (4) и анафазе-телофазе (8); 5 – рассеивание хромосом в метафазе; 6 и 12 – простые и сложные мосты в анафазе (6) и телофазе (12); 7 – забегание хромосом в анафазе; 9 – ассиметричный митоз; 10 – многополюсный митоз, обособившиеся группы хромосом в анафазе; 13 – неравноценные по величине ядра в телофазе; 14 – кольцевые хромосомы в метафазе и анафазе.

Показано, что реакция различных генотипов на стресс неоднозначна, что отражает их различные адаптивные возможности и устойчивость к неблагоприятным воздействиям. Это свидетельствует о возможности отбора по данным цитогенетического анализа материнских деревьев, представляющих ценность для создания защитных насаждений на антропогенно загрязненной территории.

2. Влияние нитрата свинца на цитогенетические показатели сосны обыкновенной

Известно, что период прорастания семян и образования проростков характеризуется повышенной чувствительностью к неблагоприятным факторам среды. Цитогенетическое изучение проростков, выращенных из семян, обработанных раствором $Pb(NO_3)_2$ разной концентрации (от 0,5 до 2000 мкМ, что соответствует примерно от 3,5 до 14 000 ПДК) показало, что сосна обыкновенная проявляет высокую чувствительность к относительно низким концентрациям (выявленный порог чувствительности составляет 5 мкМ). В этом случае отмечено статистически достоверное увеличение (в 2 раза) частоты ПМ и доли микроядер (в 6 раз) по сравнению с контролем (табл. 1). С увеличением концентрации свинца до 2000 мкМ усиливается и генотоксичность ТМ. Происходит заметное ингибирование митоза проростков семян сосны обыкновенной, проявляющееся в существенном увеличении доли клеток на стадии метафазы и промежуточной стадии мета-анафазы (10,2 % против 1,2 % в контроле) (табл. 2). Причиной этого может быть блокировка полимеризации тубулина микротрубочек веретена деления под влиянием ионов свинца [Klarheck, 1995]. Вместе с тем, снижение митотической активности может обеспечить дополнительное время для репарации

повреждений (слабых дефектов) хромосомного материала при переходе клеток через точки проверки «checkpoint» клеточного цикла. Ранее было показано [Rieder, 1992] влияние ионов ТМ на увеличение длительности клеточного цикла за счет значительного удлинения продолжительности G_2 фазы, на которой происходит синтез тубулина. Кроме того, в наших опытных образцах цитоплазма имела зернистую вакуолизированную структуру, что может быть вызвано связыванием ионов ТМ с белками цитоплазмы и их денатурацией.

Таблица 1

Изменчивость цитогенетических показателей в корневой меристеме сосны обыкновенной при воздействии различных концентраций нитрата свинца.

Различия с контролем достоверны при: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Выборка	Цитогенетические показатели, %		
	МИ	ПМ	микроядра
Контроль	8,0±0,2	2,8±0,2	0,01±0,007
0,5 мкМ	7,9±0,1	2,9±0,2	0,01±0,007
5 мкМ	7,9±0,1	5,1±0,4***	0,06±0,013*
50 мкМ	7,1±0,1**	6,1±0,3***	0,13±0,014***
500 мкМ	6,5±0,1**	9,4±0,3***	0,21±0,014***
1000 мкМ	6,2±0,1**	13,3±0,4***	0,61±0,021***
2000 мкМ	6,0±0,1**	19,4±0,4***	0,88±0,039***

Таблица 2

Доля клеток (в %) на каждой стадии митоза в корневой меристеме сосны обыкновенной при воздействия нитрата свинца.

Различия с контролем достоверны при: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Выборка	Стадия митоза				
	Профаза	Метафаза	Мета-анафаза	Анафаза	Телофаза
Контроль	10,4±0,5	30,2±0,9	1,2±0,2	28,4±0,5	29,8±0,4
0,5 мкМ	9,8±0,4	31,2±1,2	1,3±0,2	27,6±0,7	30,1±0,4
5 мкМ	10,2±0,5	35,2±1,3***	5,3±0,3***	22,3±1,3***	27,0±1,3**
50 мкМ	6,6±0,3***	35,9±0,9***	6,8±0,3***	25,6±0,7***	25,1±0,7***
500 мкМ	9,9±0,6	34,4±0,9***	8,8±0,4***	21,3±0,8***	25,6±0,8***
1000 мкМ	12,0±0,7***	32,1±1,1**	9,1±0,2***	22,3±1,2***	24,5±0,7***
2000 мкМ	13,8±0,9***	31,0±1,0	10,2±0,4***	20,9±1,1***	24,1±0,8***

С увеличением концентрации свинца существенно повышается доля микроядер в интерфазных клетках (до 0,88±0,039 % против 0,01±0,007 % в контроле, т.е.

в 88 раз), что свидетельствует об ингибирующем действии ТМ на ферменты систем репарации ДНК (Таблица 1). К цитогенетическим приспособительным реакциям сосны обыкновенной к действию свинца можно отнести усиление метаболических процессов клетки (активации генов рРНК рибосом, а также синтеза дополнительных, возможно, стрессовых белков) за счет увеличения числа клеток с максимальным количеством ядрышек (10-12) в ядре. Показано, что уровень и спектр ПМ, доля клеток с микроядрами, ядрышковая активность являются чувствительными и пригодными цитогенетическими показателями для оценки генотоксичности свинца уже на ранних этапах развития.

Заключение

Показано, что у потомства деревьев *Pinus sylvestris* L., произрастающих вдоль оживленной автомагистрали Воронеж-Дон существенно изменяются цитогенетические показатели: возрастают частота ($5,1 \pm 0,3$ % против $1,2 \pm 0,3$ % в контроле) и спектр (14 типов против 5 в контроле) патологий митоза, уровень встречаемости микроядер ($0,01 \pm 0,004$ % и $0,2 \pm 0,02$ % соответственно), происходит ингибирование митотической активности ($4,2 \pm 0,4$ % против $6,5 \pm 0,3$ %). Все это свидетельствует о том, что данные древостои испытывают значительную антропогенную нагрузку.

Показано, что реакция различных генотипов на стресс неоднозначна, что позволит отобрать среди них наиболее продуктивные и устойчивые для создания лесосеменных объектов.

Воздействие нитрата свинца на проростков семян *Pinus sylvestris* L. проявлялось заметным ингибированием митоза, проявляющимся в сильном увеличении доли клеток в первую очередь на переходе метафаза-анафаза (до 14,1 %). Это может быть следствием блокировки полимеризации тубулина микротрубочек веретена деления. Появление большого числа фрагментов (до 20-30 %) и агглютинаций (до 9 %) хромосом, а также увеличение доли микроядер (до 88 раз), свидетельствует об ингибирующем действии свинца на ферменты систем репарации ДНК.

Установление закономерностей индукции цитогенетических эффектов у растений при действии ТМ необходимо для обоснования решений в природоохранной деятельности, для восстановления лесов на значительных по площади территориях, загрязненных ТМ.

Литература

1. Буторина А.К., Черкашина О.Н., Ермолаева О.В., Чернодубов А.И., Авдеева И.А. Цитогенетический мониторинг аутохтонных лесов Усманского и Хреновского боров // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2007, № 4, с. 508-512.
2. Джувеликян Х.А. Экология и человек / Х.А. Джувеликян. – Воронеж: ВГУ, 1999. – 264 с.
3. Доклад о состоянии окружающей среды на территории Воронежской области в 2010 году / отв.ред. Н.В. Стороженко. – Воронеж, 2010. – 94 с.
4. Протасова Н.А., Чарыкова А.Ю. Тяжелые металлы в почвах Усманского бора // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011, № 1, с. 117-126.
5. 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.

6. *Снежко С.И., Шевченко О.Г.* Источники поступления тяжелых металлов в атмосферу // Уч. зап. РГГМУ. – 2011, № 18, с. 57-69.
7. *Титов А.Ф.* Устойчивость растений к тяжелым металлам / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, Н.М. Казнина, Г.Ф. Лайдинен. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – 172 с.
8. *Fedorkov A.L.* (2007) Effect of heavy metal pollution of forest soil on radial growth of Scots pine. *Forest Pathology* 37(2): 136-142
9. *Klapheck S., Schlunz S., Bergmann L.* (1995) Synthesis of Phytochelatins and Homo-Phytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* 107(2): 515-521.
10. *Rieder C.L., Palazzo R.E.* (1992) Colcemid and the mitotic cycle. *Journal of Cell Science* 102(3): 387-392.