УДК 575:504.732.05

ВЛИЯНИЕ НИТРАТА СВИНЦА НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© М.В. Белоусов, О.А. Землянухина

Ключевые слова: сосна обыкновенная; свинец; цитогенетические и биохимические показатели.

Показано существенное влияние нитрата свинца на цитогенетическую изменчивость проростков сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris L.*). Выявлена бóльшая чувствительность цитогенетических показателей (доля клеток на переходной стадии мета-анафазы, уровень и спектр патологических митозов, частота встречаемости микроядер) по сравнению с активностью и изозимным спектром дыхательных ферментов.

ВВЕДЕНИЕ

Реакция растений на факторы среды изучена далеко не полностью. В результате различных видов человеческой деятельности в воздух и почву выбрасывается более 200 различных компонентов. Среди них обширную группу занимают тяжелые металлы (ТМ), влияние которых на живые организмы (чаще травянистые и реже лиственные древесные растения) в последнее время активно изучается на морфофизиологическом и биохимическом уровнях [1–3]. Практически отсутствуют экспериментальные работы, направленные на изучение действия конкретных металлов на важнейшие цитогенетические и биохимические показатели хвойных растений [2].

Целью работы явилось изучение возможности оценки генотоксичности свинца на проростки сосны обыкновенной с использованием цитогенетических показателей, а также активности и изозимного спектра дыхательных ферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили семена деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) из различных древостоев Усманского бора (территория Воронежского государственного биосферного заповедника (ВГБЗ)), произрастающих в районе Краснолесного лесничества (60 квартал, 7 выдел), почвы серые лесные супесчаные. По типу лесорастительных условий – суборь свежая; состав – 100 % сосна обыкновенная.

Цитогенетическое исследование. 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 14000 ПДК, при норме 0,03 мг/л [4] 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 по зимнему времени (в пик митотической активности) 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 [5]. Просмотр препаратов осуществлялся на микроскопе Микмед-6 при увеличении 40×1,5×10. Для каждого варианта просматривали не менее 20 корешков проростков.

Нами анализировались следующие показатели: митотическая активность меристематической ткани (которая определялась по митотическому индексу – МИ); число клеток на каждой стадии митоза (в %) для определения их продолжительности; общее число патологий митоза (ПМ) и наиболее характерные типы митотических нарушений по каждой стадии; доля клеток с микроядрами; доля клеток с *n* количеством ядрышек в интерфазных клетках. Для каждой экспериментальной выборки изготавливалось по 20–22 микропрепаратов. В итоге было просмотрено более 150000 клеток. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ «Stadia» и «Statistica» [6].

Биохимические методы исследования. Для биохимических исследований использовали проростки тех же опытных вариантов с нитратом свинца, что и для цитогенетических исследований. Полученные результаты сравнивали с контролем. Определяли активность ферментов: пероксидазы (ПО; К.Ф. 1.11.17), изоцитратдегидрогеназы (ИДГ; К.Ф. 1.1.1.42), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-Ф-ДГ; К.Ф. 1.1.1.49), НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ; К.Ф. 1.6.99.3), НАДФН-дегидрогеназы (НАДФН-ДГ; К.Ф. 1.6.99.1), малик-фермента (МФ; К.Ф. 1.1.1.39) [7].

Электрофорез нативных молекул белка проводили по методике Девиса; электрофорез белкового спектра – по методике Леммли; выявляли изоферментный спектр пероксидазы (ПО; К.Ф. 1.11.17), эстеразы (К.Ф. 3.1.1-),

малат-дегидрогеназы (МДГ-37; К.Ф. 1.1.1.37), малик-фермента-40 (МФ-40; К.Ф. 1.1.1.40) [8, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Лабораторная всхожесть семян (определенная на 15 день проращивания) составила в контрольном варианте 75,5±4,3 %, а в опытных вариантах варьировала от 37 до 67 % (с понижением % всхожести по мере увеличения концентрации нитрата свинца). В опытных вариантах рост корешков проростков был крайне замедлен, и они с трудом достигали нужной для фиксации длины.

Цитогенетический анализ. С возрастанием концентрации нитрата свинца отмечено достоверное (начиная с 50 мкМ и выше) снижение МИ (от 8 % в контроле до 6,0–7,9 % в опытных вариантах). В опытных вариантах выявлено существенное преобладание (по сравнению с контролем) доли клеток на стадии метафазы и мета-анафазы с заметным снижением доли клеток на стадии профазы (табл. 1).

Ингибирование митотической активности может быть связано с задержкой митоза на стадии метафазы и перехода метафаза-анафаза (в табл. 3 приведены данные их отдельного и совместного подсчета) в опытных вариантах (от 40 до 46,5 против 29,9 % в контроле). Причиной этого может быть блокировка полимеризации тубулина микротрубочек веретена деления под действием свинца, что наблюдалось рядом авторов на других объектах [10, 11].

Достоверное увеличение частоты ПМ наблюдается (табл. 1), начиная с концентрации нитрата свинца 5 мкМ (5,1 % по сравнению с 2,8 % в контроле и 2,9 % при концентрации 0,5 мкМ), что превышает пределы нормального значения уровня спонтанного мутирования в средней полосе России до 5 % [12].

Полученные данные свидетельствуют о большей чувствительности показателя ПМ к действию свинца по сравнению с МИ (ингибирование наблюдалось при концентрации 50 мкМ, что в 10 раз выше порога чувствительности показателя ПМ).

В контроле спектр ПМ был представлен забеганиями и отставаниями хромосом в анафазе и мостами в анафазе и телофазе. Такие нарушения могли быть следствием спонтанного мутационного процесса в результате флуктуации погодных факторов или действия вторичных метаболитов, образующихся в ходе нормальных метаболических процессов в организме, которые в большинстве случаев исправляются репарационными системами клетки. В опытных вариантах, кроме вышеотмеченных ПМ, выявлены: фрагментация и обособление группы хромосом в метафазе, а также сложные нарушения (мост + отставание хромосом в анафазе, мост + частичная агглютинация хромосом в ана-телофазе, разорванные мосты, разорванные мосты при делении ядра и микроядра). Присутствие хромосомных перестроек свидетельствует о повышении уровня мутационного процесса (хромосомных перестроек) под воздействием нитрата свинца. Кроме того, отмечены нарушения несовместимые с жизнью, отсутствующие в контроле (агглютинация хромосом; существенная доля микроядер).

При увеличении концентрации нитрата свинца растет и количество микроядер, превышающее контроль до 88 раз (табл. 1). Достоверное увеличение происходит (как и у ПМ) при концентрации 5 мкМ, что свидетельствует о существенном повышении доли нерепарированных повреждений хромосомного материала.

Ядрышковая активность у сосны способна изменяться в широких пределах, что проявляется в присутствии в клетках от 1 до 12 ядрышек. Причем количество ядрышек возрастает в экстремальных условиях [5]. В контрольном варианте преобладают клетки с 3–5 ядрышками (с максимумом – клетки с 4 ядрышками), что является нормой для сосны обыкновенной [12] и свидетельствует о преобладающей активности ядрышковых организаторов двух-трех пар хромосом. В опытных вариантах преобладают клетки с 5–8 ядрышками в клетке (с максимумом клеток с 6 ядрышками). Причем существенно возрастает число клеток с максимальным количеством ядрышек (с 10–12 ядрышками в ядре) по

Таблица 1

Влияние различных концентраций нитрата свинца на цитогенетические показатели сосны обыкновенной

Цитогенетические показатели, %		Контроль	0,5 мкМ	5 мкМ	50 мкМ	500 мкМ	2000 мкМ
МИ		8,0±0,2	7,9±0,1	7,9±0,1	7,1±0,1[2]	6,5±0,1[2]	6,0±0,1[2]
Доля клеток на стадии митоза	Профаза	22,7±1,1	20,6±1,0[3]	13,9±0,3[3]	13,3±0,3[3]	12,5±0,3[3]	11,5±0,3[3]
	Метафаза	28,8±1,0	29,0±1,0	33,6±0,5[2]	34,2±0,5[2]	34,6±0,5[2]	32,4±0,7[2]
	Метафаза-анафаза	1,0±0,2	1,4±0,2[2]	6,4±0,3[3]	7,9±0,2[3]	10,0±0,3[3]	14,1±0,4[3]
	Доля метафаз +мета-анафаз	29,9±1,0	30,5±1,0[3]	40,0±0,5[3]	42,1±0,6[3]	44,5±0,4[3]	45,6±0,7[3]
	Анафаза	29,2±0,5	28,4±0,4[2]	28,9±0,4	27,9±0,5[2]	27,4±0,5[2]	27,2±0,5[2]
	Телофаза	18,3±0,6	20,5±0,3[3]	17,2±0,6	16,7±0,7[2]	15,6±0,5[2]	15,8±0,4[3]
ПМ		2,8±0,2	2,9±0,2	5,1±0,4[3]	6,1±0,3[3]	9,4±0,3[3]	19,4±0,4[3]
Типы ПМ (доля от всех нарушений)	Забегания хромосом в анафазе	54,2±6,2	49,1±6,3[2]	41,0±3,2[3]	41,1±2,5[3]	42,6±1,6[3]	36,5±1,2[3]
	Мосты	28,3±4,5	25,0±4,4[2]	28,7±2,5	31,5±1,9[3]	23,0±1,7[3]	14,5±0,8[3]
	Отставания хромосом в анафазе	17,5±6,2	19,2±6,2[2]	16,8±3,2[3]	10,6±2,3[3]	13,1±0,8[3]	7,6±0,7[3]
	Сложные нарушения	0	1,7±1,7	2,9±1,6	3,3±1,8	5,3±1,5	6,9±1,2
	Фрагментация хромосом	0	3,3±2,3	8,3±2,7	11,4±2,7	13,4±2,7	32,4±1,9
	Обособление группы хромосом	0	1,7±1,7	2,3±1,6	2,1±1,6	2,6±1,2	2,1±0,7
Доля клеток с микроядрами		0,01±0,007	0,01±0,007	0,06±0,013[1]	0,13±0,014[3]	0,21±0,014[3]	0,88±0,039[3]

Примечание. Различия с контролем достоверны при: [1] – $P < 0,05$; [2] – $P < 0,01$; [3] – $P < 0,001$.

сравнению с контролем (в среднем в 3–5 раз), что может быть еще одним показателем усиления метаболической активности под воздействием стресса (нитрата свинца).

Биохимические исследования. Все изученные ферменты по характеру воздействия нитрата свинца условно можно разделить на три группы. К первой группе относятся ПО, НАДН-ДГ и в меньшей степени Гл-6-Ф-ДГ. Результаты показывают, что активность данных ферментов в неблагоприятных условиях незначительно возрастает с последующим снижением (изменения начинаются при концентрации 500 мкМ). Ко второй группе можно отнести ИДГ. Активность этого фермента при действии неблагоприятного фактора возрастает (также только при 500 мкМ) и далее остается неизменной при всех изученных концентрациях свинца. К третьей группе относятся НАДФН-ДГ и МФ. Данные энзимы характеризуются отсутствием или незначительными изменениями при действии ТМ при всех концентрациях (табл. 2).

1) Характер зависимости активности ПО (маркер стресса и адаптации) от концентрации нитрата свинца указывает на компенсаторную деятельность клеток в ответ на действие неблагоприятного фактора. При концентрации 500 мкМ происходит увеличение активности фермента в 1,5–2 раза (табл. 2). Это увеличение свидетельствует о частичной нейтрализации солевого стресса. Однако дальнейшее повышение концентрации соли свинца приводит к резкому падению активности (в 2 раза ниже, чем в контроле), что подтверждается цитогенетическими исследованиями: с увеличением концентрации свинца наблюдается повышение уровня и спектра ПМ, увеличение доли микроядер. Об этом же свидетельствует то, что применение ТМ в концентрации 5000 мкМ приводит к полной утери жизнеспособности клеток. Аналогичный характер изменения кривой активности фермента показан и для НАДН-ДГ (фермента, играющего одну из важнейших ролей в клеточном дыхании) и Гл-6-Ф-ДГ, являющимся ключевым ферментом пентозофосфатного цикла, достаточно устойчивого в стрессовых условиях [13].

2) ИДГ является представителем метаболического пути ЦТК (цикла трикарбоновых кислот), активность которого в меньшей степени зависит от нарушения солевого режима, чем описанные выше энзимы. В ответ на действие неблагоприятного фактора активность фермента увеличивается (при концентрации 500 мкМ), как это наблюдалось и для энзимов первой группы, но, в отличие от них, его активность не падает вплоть до воздействия свинца в концентрации 2000 мкМ и выходит на плато (табл. 2).

3. Ферменты, относящиеся к условно выделенной третьей группе, – это НАДФН-ДГ и МФ. Их активность остается практически неизменной при всех концентрациях нитрата свинца (табл. 2).

В качестве представителя первой группы ферментов для выявления изозимного спектра была взята ПО. В общем, рисунок изоферментного спектра, представленного в виде таблицы со значениями R_f (относительная электрофоретическая подвижность), соответствует увеличению активности ПО (табл. 3). Спектр контрольных растений обнаруживают более слабые зоны активности, чем спектры при 2000 мкМ нитрата свинца. При увеличении концентрации ТМ также происходит изменение в количестве зон энзима. Если у контрольных вариантов наблюдаются только пять полос ПО, то у опытных вариантов их число увеличивается до десяти, причем области в верхней части геля становятся ярко окрашенными, а в средней части появляются слабо окрашенные дополнительные зоны. Исчезает зона с R_f = 0,154, вместо нее появляется зоны с R_f = = 0,066; 0,176 и (для концентраций более 1000 мкМ) 0,375; 0,390; 0,404. Все это свидетельствует о приспособительном характере метаболизма растений к неблагоприятным условиям. Из литературных данных [7, 13] известно, что адаптация к неблагоприятным условиям часто сопровождается подавлением белкового синтеза. Возможно, что действие нитрата свинца также приводит к снижению количества общего белка и в силу этого к снижению общей активности некоторых ферментов.

Однако выявленные изменения характерны для более высоких концентраций нитрата свинца (начиная с 500 мкМ), что позволяет сделать вывод о большей информативности и чувствительности цитогенетических показателей (уровень и спектр ПМ, частота встречаемости микроядер, доля мета-анафаз), где достоверные изменения наблюдаются уже при концентрации 5 мкМ, что в 100 раз ниже.

Одним из адаптивных ферментов растительных организмов, обладающих значительным полиморфизмом и высокой индивидуальной специфичностью, является

Таблица 2

Влияние различных концентраций нитрата свинца на активность ферментов в проростках сосны обыкновенной

Активность фермента, Е/г сырой массы	Контроль	500 мкМ	1000 мкМ	2000 мкМ
ПО	12,68	22,07	5,54	4,21
НАДН-ДГ	0,03	0,04	0,02	0,03
Гл-6-Ф-ДГ	0,05	0,06	0,05	0,05
ИДГ	0,33	0,46	0,47	0,47
НАДФН-ДГ	0,01	0,01	0,01	0,01
МФ	0,33	0,31	0,30	0,28

Таблица 3

Влияние нитрата свинца на изоферментный спектр ПО у сосны обыкновенной

R_f	Контроль	500 мкМ	1000 мкМ	2000 мкМ
0,066	—	+	+	++
0,096	+	++	++	+++
0,154	+	—	—	—
0,176	—	+	+	+
0,221	++	++	++	++
0,279	+++	+++	+++	+++
0,316	+	+	+	+
0,375	—	—	+	+
0,390	—	—	+	+
0,404	—	—	+	+

Примечание. + – степень выраженности активности фермента.

неспецифическая эстераза. Несмотря на то, что между отдельными растениями наблюдается разница в спектрах фермента, тем не менее, она скорее свидетельствует об индивидуальных различиях между семенами в их генотипах, чем о влиянии неблагоприятного фактора. Другими словами, эстераза проявляет устойчивость спектра при всех концентрациях ТМ. Аналогичная картина показана для изоферментного спектра МФ-40. Так как активности МДГ-37 тоже не обнаружено, то на геле, проявляемого на активность данного энзима, выявляется спектр супероксиддисмутазы (СОД) [14], который также не отличается от контроля.

Результаты белкового спектра не показали различий в окрашенных зонах у всех исследованных образцов. Это говорит о том, что действие ионов ТМ не проявляется на субъединичном уровне белков. Скорее всего, изменение активности ферментов также происходит в уже синтезированных молекулах, а не является результатом действия ТМ, вызывающим синтез *de novo* аномальных молекул энзимов.

В связи с этими результатами можно сделать вывод, что использованные нами ферментативные системы являются менее чувствительными, чем цитогенетические показатели. Возможно, это объясняется неким запасным пулом ферментов, которые еще существуют на момент хромосомных нарушений. Именно поэтому представленные изозимные спектры достаточно стабильны и однородны как у контрольных, так и опытных вариантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена большая чувствительность цитогенетических показателей (доля клеток на переходной стадии мета-анафазы, уровень и спектр патологических митозов, частота встречаемости микроядер) по сравнению с активностью и изозимным спектром использованных нами дыхательных ферментов: Гл-6-Ф-ДГ, ПО, ИДГ, НАДН-ДГ, НАДФН-ДГ и др.

Изучение цитогенетических реакций сосны обыкновенной на воздействие ТМ позволит определить уже на ранних этапах их генотоксический эффект; характер, специфику и механизмы воздействия на цитогенетический аппарат; чувствительность к этим факторам различных цитогенетических показателей и др. 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. *Montvydiene D., Marciulioniene D.* Assessment of toxic interactions of heavy metals in a multicomponent mixture using Lepidium sativum and Spirodela polyrrhisa // Environment. Toxicology. 2004. V. 19. P. 351-358.
2. Устойчивость растений к тяжелым металлам / Титов А.Ф. [и др.]. Петрозаводск, 2007. 172 с.
3. *Кулаева О.А., Цыганов В.Е.* Молекулярно-генетические основы устойчивости высших растений к кадмию и его аккумуляции // Экологическая генетика. 2010. Т. 8. № 3. С. 3-15.
4. *Джувеликян Х.А.* Экология и человек. Воронеж, 1999. 264 с.
5. Цитогенетические реакции семенного потомства сосны обыкновенной на комбинированное антропогенное загрязнение в районе Новолипецкого металлургического комбината / Машкина О.С. [и др.] // Экологическая генетика. 2009. Т. 7. № 3. С. 17-29.
6. *Кулаичев А.П.* Методы и средства комплексного анализа данных. М., 2006. 512 с.
7. *Епринцев А.Т., Федорина О.С.* Функционирование малатдегидрогеназной системы в мезофилле и обкладке листьев кукурузы в условиях солевого стресса // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 820-827.
8. *Davis B.J.* Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci.. 1964. V. 121. P. 404-427.
9. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685.
10. The molecular mechanism of interaction of Et_3Pb^+ with tubulin / Faulstich H. [et al.] // FEBS. 1984. V. 174. № 1. P. 128-132.
11. Закономерности индукции цитогенетических эффектов у растений при действии тяжелых металлов / Евсеева Т.И. [и др.] // Вестник института биологии. 2005. Т. 87. № 1. С. 4-13.
12. Цитогенетический мониторинг аутохтонных лесов Усманского и Хреновского боров / Буторина А.К. [и др.] // Известия РАН. Сер.: биологическая. 2007. № 4. С. 508-512.
13. *Чиркова Т.В.* Физиологические основы устойчивости растений. СПб., 2002. 244 с.
14. *Левитес Е.В.* Генетика изоферментов растений. Новосибирск, 1986. 145 с.

БЛАГОДАРНОСТИ: Исследования поддержаны Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры для инновационной России» (ГК N П395, П270, 14.740.11.0114, 14.740.11.0169).

Поступила в редакцию 28 июля 2011 г.

Belousov M.V., Zemlyanukhina O.A. NITRATE LEAD INFLUENCE ON CYTOGENETIC AND SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF SCOTCH PINE SEEDLINGS

Nitrate lead essential influence on cytogenetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings is shown. Greater sensitivity of cytogenetic parameters (a share of cells at a transition stage meta-anaphase, a level and a spectrum of pathological mitosis, micronuclei frequency of occurrence) in comparison with respiratory enzymes activity and isoenzyme spectrum is revealed.

Key words: scotch pine; lead; cytogenetic and biochemical parameters.