

УДК 502.5:576.353

МИТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ ALLIUM CERA L. ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ ПЕСТИЦИДОВ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Ибрагимова Э.Э.

*Республиканское высшее учебное заведение «Крымский инженерно-педагогический университет», Симферополь, Украина
E-mail: evelina_biol@mail.ru*

В статье приведены результаты исследования митотической активности клеток корневой меристемы *Allium cera* L. при совместном действии пестицидов и тяжелых металлов. Установлено, что тяжелые металлы в высоких концентрациях совместно с остаточными количествами пестицидов вызывают выраженное негативное цитотоксическое воздействие на тест-систему *Allium cera* L., проявляющееся в ингибировании митотической активности клеток корневой меристемы.

Ключевые слова: митоз, тяжелые металлы, пестициды, *Allium cera* L.

ВВЕДЕНИЕ

Современное сельское хозяйство является одним из основных источников антропогенного загрязнения. По мнению Гниненко Н.В. с соавторами [1], сложившаяся система земледелия на черноземах степной зоны Украины привела к значительному уменьшению содержания гумуса, ухудшению структуры и других агрономических параметров почв. Многие исследователи отмечают, что при интенсивном ведении земледелия преобладающим фактором почвообразования становится антропогенный [2]. В связи с этим исследование почвы как основного фонового субстрата, обуславливающего мутационный процесс в растительных организмах, представляет значительный научный и практический интерес. Абдурахмановой А.А. [3] для индикации мутагенной активности загрязненных почв, подвергавшихся в течение длительного времени воздействию пестицидов и минеральных удобрений, использовались корешки лука и хлопчатника. Почвы, в которых остаточные количества пестицидов превышали ПДК, оказывали сильное мутагенное действие на семена исследованных тест-растений. Автор отмечает, что тест-система лука более чувствительна к мутагенам, чем хлопчатник. Аналогичное исследование было проведено Butani J.V. и Shukla P.T. [4], изучавшими цитологию корня лука при действии фунгицидов (карбендазим, манкоцеб, тридеморф), инсектицидов (монокротофос, оксидиметонметил, хинальфос) и гербицидов (оксифлуортен, флухлоралин, алахлор), используя рекомендуемые и более высокие дозы. При действии всех пестицидов, кроме карбендазима, отмечено уменьшение процента прорастания обработанных семян и снижение митотического индекса.

Ингибирование митоза зависело от продолжительности воздействия и концентрации пестицида. Arif M. и Vahidy A.A. [5] при оценке генотоксического действия фунгицидов нимрода и дитана на митотический процесс меристематических корней *Allium cepa* L. также указывают, что при повышении концентрации изученных препаратов наблюдалось снижение митотического индекса, увеличение доли аномалий: полиплоидии, К-митоза, нарушений метафазы. Частота встречаемости нарушений положительно коррелировала с увеличением концентрации пестицидов и продолжительностью их действия. Аналогичное исследование с использованием корешков *Allium cepa* L. проводилось для изучения действия органофосфорного пестицида малатиона, который снижал частоту деления клеток, что проявлялось в нарушении митотического цикла и снижении митотического индекса [6]. Интересным остается вопрос влияния пестицидов в малых концентрациях на процесс деления клеток тест-культур. Также мало изученным остается совместное влияние остаточных количеств пестицидов и тяжелых металлов, содержащихся в почвах, на растения, так как большое количество агроценозов сосредоточено вдоль автотрасс, в результате чего загрязнение почв тяжелыми металлами неизбежно.

В связи с этим цель исследования заключалась в определении митотической активности клеток корневой меристемы *Allium cepa* L. при совместном воздействии остаточных количеств пестицидов и тяжелых металлов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами был проведен анализ загрязнения сельскохозяйственных почв Крыма остаточными количествами пестицидов (байлетон, БИ-58, инсегар) и тяжелыми металлами (медь, цинк, свинец). Для исследования были выбраны следующие территории, расположенные вдоль автотрасс с различной интенсивностью движения: I – Бахчисарайский район (с. Брянское) – низкая интенсивность движения, II – пригородная зона г. Алушты – средняя загруженность, III – Симферопольский район (с. Кольчугино) – высокая интенсивность движения автотранспорта. Методы определения тяжелых металлов (ТМ) и остаточных количеств пестицидов (ОКП), а также их содержание описаны в предыдущей публикации [7]. Контролем служили почвенные образцы с территорий, находящихся на значительном расстоянии от техногенных источников, в качестве фоновых (Ф) использовались образцы почв придорожной зоны автотрасс с интенсивным движением автотранспорта. В исследованных почвенных образцах сельскохозяйственных угодий обнаружены ОКП (байлетон, БИ-58, инсегар) в количествах ниже ПДК, ТМ (свинец и медь) – выше ПДК. Содержание ТМ в почвах: Симферопольский район > Алушта > Бахчисарайский район > Фон. В фоновых образцах концентрация ТМ – в пределах ПДК.

Для биотестирования отобранных в указанных районах почвенных образцов использовали тест-систему лука. Для анализа семена лука высевали в кюветы с почвами исследуемых сельскохозяйственных угодий. Проращивание семян проводили при температуре 22⁰ С в темноте. На третьи сутки проросшие семена лука с корешками длиной 0,8–1,5 см фиксировали в уксуснокислом спирте (3:1) в течение 24 ч, после чего переводили в 70%-ный этиловый спирт, где хранили при

температуре + 5⁰С до изготовления препаратов. Цитогенетический анализ осуществляли на временных давленных препаратах по методу Паушевой З.П. [8]. Корешки лука окрашивали ацетолакмоидом с кипячением на водяной бане в течение 10 мин, а затем материал переносили на 5 мин в 45%-ную уксусную кислоту. Мацерацию проводили в хлоралгидрате.

Токсичность поллютантов на тканевом уровне оценивали по изменению митотического индекса, который выражали в процентах (%). Для этого на препаратах подсчитывали число митозов в определенном количестве срезов; отдельно учитывали общее число клеток на этих же срезах. Затем определяли отношение среднего числа митозов к среднему числу клеток в одном срезе и умножали на 100. Митотический индекс (*MI*) в клетках тест-культуры определяли по формуле:

$$MI = \frac{П + М + А + Т}{И + П + М + А + Т} \cdot 100 \quad \text{где}$$

П – количество клеток корневой меристемы на стадии профазы;

М – количество клеток корневой меристемы на стадии метафазы;

А – количество клеток корневой меристемы на стадии анафазы;

Т – количество клеток корневой меристемы на стадии телофазы;

И – количество клеток корневой меристемы на стадии интерфазы [8].

Относительную длительность каждой фазы митоза (%) рассчитывали по формуле, для профазы она выглядит следующим образом:

$$П = \frac{П \cdot 100}{П + М + А + Т}$$

Исследования проводили в четырехкратной повторности. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета прикладных программ “Microsoft Excel 2000”. Достоверность различий данных определяли с помощью t-критерия Стьюдента [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ митотической активности клеток корневой апикальной меристемы *A. сера*, пророщенных в почвах, загрязненных ТМ и ОКП позволил установить прогрессирующее снижение митотического индекса по мере возрастания концентраций загрязняющих веществ. В I и II вариантах исследования (ТМ+ОКП) митотический индекс снижался в 1,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и в 1,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с фоновыми (ТМ) значениями, в III зоне (ТМ+ОКП) – в 1,3 ($p < 0,001$) и 1,2 ($p < 0,001$) раза соответственно. Наряду с изменением митотического индекса по всем вариантам исследования было обнаружено достоверное, по сравнению с контрольным вариантом, различие в процентном соотношении фаз митотического цикла (рис. 1).

МИТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ ...

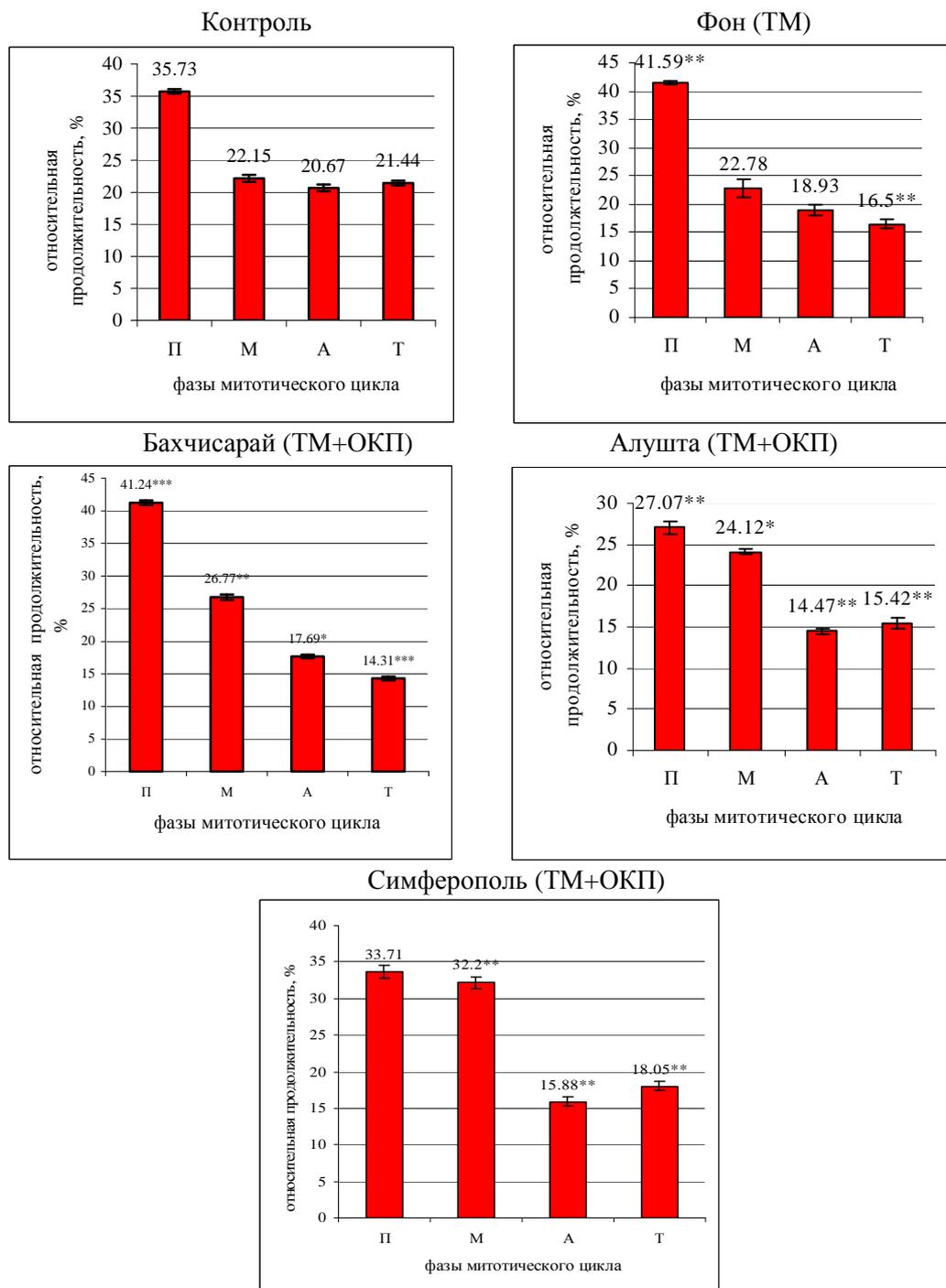


Рис. 1. Доля (%) профаз, метафаз, анафаз и телофаз среди делящихся клеток корневой меристемы семян *Allium cepa* L., пророщенных в субстратах с различным содержанием ТМ и ОКП и в контроле (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$)

При не изменяющемся существенно значении митотического индекса в фоновом варианте (ТМ) на 16,40% ($p < 0,01$) увеличивалось количество клеток на стадии профазы за счет снижения доли клеток, находящихся на стадии телофазы на 23,04% ($p < 0,01$). По-видимому, формирование профазного блока инициируется наличием ТМ в фоновых почвенных образцах. В I варианте (ТМ+ОКП) исследования было обнаружено увеличение общего количества клеток, находящихся на стадии профазы на 15,42% ($p < 0,001$) и метафазы на 20,85% ($p < 0,01$) за счет снижения доли анафаз на 14,41% ($p < 0,05$) и телофаз на 33,25% ($p < 0,001$) среди делящихся клеток по сравнению с контрольным вариантом, то есть формировался профазно-метафазный блок. Очевидно, что на продолжение клеточного цикла поллютанты II и III вариантов исследования оказывали более существенное влияние, чем в I варианте, что выражалось в достоверном изменении доли фаз митотического цикла. В частности, во II варианте исследования регистрировалось снижение процентного содержания профаз на 24,24% ($p < 0,01$), анафаз – 30,00% ($p < 0,01$) и телофаз – 28,08% ($p < 0,01$) при увеличении метафаз на 8,89% ($p < 0,05$) (рис. 1).

В III варианте исследования (ТМ+ОКП) количество клеток на стадии профазы не отличалось от контрольного варианта ($p > 0,05$), однако достоверно возрастало на стадии метафазы – 10,05% ($p < 0,01$) при снижении анафаз – 4,79% ($p < 0,01$) и телофаз – 3,39% ($p < 0,01$), т. е. имело место формирование метафазного блока.

Таким образом, в фоновых почвах (ТМ) наблюдалось формирование профазного блока в клетках корневой меристемы *A. sepa*. Поллютанты почв I зоны (ТМ+ОКП) индуцировали формирование профазно-метафазного блока при существенном снижении доли ана-телофаз. При увеличении содержания загрязняющих веществ в почвах II и III зоны (ТМ+ОКП) было обнаружено достоверное увеличение процентного содержания метафаз при снижении общего количества клеток на стадии профазы, анафазы и телофазы. Таким образом, при повышении концентраций загрязняющих веществ в исследованных почвах, наблюдалось увеличение количества клеток на стадии профазы и метафазы при соответствующем уменьшении ана-телофазных клеток, а также снижение митотической активности клеток апикальной меристемы корешков лука. Полученные данные согласуются с положением [10], что дифференциальная чувствительность фаз клеточного цикла к химическим мутагенам осложняет не только задачу выявления механизмов действия на клетки изучаемых факторов, но и оценку силы их влияния. Снижение митотического индекса и различие в процентном соотношении фаз митоза в исследованных опытных вариантах (ТМ+ОКП) по сравнению с контролем и фоном (ТМ) по-видимому, может свидетельствовать о том, что имеет место синергизм ОКП и ТМ, так как при их совместном влиянии наблюдалось ингибирование митотической активности клеток апикальной меристемы лука.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Остаточные количества пестицидов (байлетон, БИ-58, инсегар) и тяжелые металлы (медь, цинк, свинец) оказывают комплексный цитотоксический эффект, проявляющийся в снижении митотического индекса клеток апикальной меристемы корешков *Allium sepa* L.

2. Тяжелые металлы и остаточные количества пестицидов оказывают более выраженное ингибирующее действие на частоту митоза в клетках *Allium cepa* L., чем отдельно присутствующие в среде выращивания растений тяжелые металлы.
3. В клетках корневой меристемы семян, пророщенных в фоновых почвах (ТМ), наблюдалось формирование профазного блока. Поллютанты почв I зоны (ТМ+ОКП) индуцировали формирование профазно-метафазного блока при существенном снижении доли ана-телофаз. При увеличении содержания загрязняющих веществ в почвах II и III зоны (ТМ+ОКП) было обнаружено достоверное увеличение процентного содержания метафаз при снижении общего количества клеток на стадии профазы, анафазы и телофазы.

Список литературы

1. Гниненко Н.В. Некоторые аспекты эволюции черноземов при их длительном интенсивном сельскохозяйственном использовании / Н.В. Гниненко, Е.В. Коваленко, В.И. Чабан, С.П. Клявзо // Почвоведение. – 1998. – № 6. – С. 732–738.
2. Абдурахманова А.А. Мутагенное действие многолетнего внесения в почву пестицидов и минеральных удобрений на семена хлопчатника и лука / А.А. Абдурахманова // Генет. эффекты антропог. загряз. среды в Зарафшанской долине. Сбор. науч. тр. – Самарканд: СамГУ, 1989. – С. 20–26.
3. Узунов К. Тежки метали (Mn, Pb, Zn, Cu) в почви и растения в Софийската котловина / К. Узунов, В. Захариева, В. Коларова, В. Драгостинова, Й. Узунов // Геохим., минерал. и петрол. – 1996. – Т. 31. – С. 103–123.
4. Butani J.V. Cytological effects of pesticides on onion (*Allium cepa* L.) root tip / Butani J.V., Shukla P.T. // Gujarat. Agr. Univ. Res. J. – 1994. – Vol. 20, № 1. – P. 60–65.
5. Arif M. Toxicity of fungicides Nimrod and Dithane M-45 on mitotic cells of *Allium cepa* L. / Arif M., Vahidy A. A. // Phillip. J. Sci. – 1996. – Vol. 125, № 4. – P. 271–289.
6. Priya E. Genotoxic effect of an organophosphorous pesticide on *Allium* root meristems in vivo / Priya E., Joyce S., Gowrishankar B., Rajaiah D. // Indian J. Exp. Biol. – 1996. – Vol. 34, № 4. – P. 320–324.
7. Ибрагимова Э.Э. Экологическая и фитотоксическая оценка загрязнения сельскохозяйственных почв Крыма пестицидами и тяжелыми металлами / Э.Э. Ибрагимова // Ученые записки Таврического нац-го ун-та им. В.И. Вернадского (серия «Биология, химия»). – 2007. – Т. 20 (59). – № 2. – С. 16–25.
8. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Колос 1980. – 304 с.
9. Плохинский Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. – М.: МГУ, 1970. – 367 с.
10. Евсеева Т.И. Токсические и цитогенетические эффекты, индуцируемые у *A. cepa* низкими концентрациями Cd и ²³²Th / Т.И. Евсеева, Т.А. Майстренко, С.А. Гераськин, Е.С. Белых, Е.В. Казакова // Цитол. и генетика. – 2005. – № 5. – С. 73–80.

Ибрагимова Е.Е. Мітотична активність клітин кореневої меристеми *Allium cepa* L. при спільній дії пестицидів і важких металів / Е.Е. Ібрагимова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 56–63.

У статті приведені результати дослідження мітотичної активності клітин кореневої меристеми *Allium cepa* L. при спільній дії пестицидів і важких металів. Встановлено, що важкі метали у високих концентраціях спільно із залишковими кількостями пестицидів викликають виражену негативну цитотоксичну дію на тест-систему *Allium cepa* L., що проявляється в інгібуванні мітотичної активності клітин кореневої меристеми.

Ключові слова: митоз, важкі метали, пестициди, *Allium cepa* L.

MITOTICAL ACTIVITY OF CELLS OF ROOT MERISTEMS OF *ALLIUM CEPA* L. AT THE UNITED ACTION OF PESTICIDES AND HEAVY METALS

Ibragimova E.E.

*Republican higher educational establishment is the “Crimean engineer-pedagogical university”,
Simferopol, Ukraine
E-mail: evelina_biol@mail.ru*

The article deals with the results of research of mitotical activity of cells of root meristems of *Allium cepa* L. which are driven at the action of heavy metals, and also at the united action of remaining amounts of pesticides and heavy metals. The analysis of contamination of agricultural soils of Crimea was conducted by the remaining amounts of pesticides (bayleton, BI-58, insegar) and heavy metals (copper, zinc, lead). For research the next territories located along motorways with different intensity of motion were chosen: I – the Bakhchisarai district (p. Bryanskoe) is subzero intensity of motion, II – is a suburban zone Alushta is a middle work-load, III – the Simferopol district (p. Colchugino) is high intensity of motion of motor transport. In the investigational soil standards of agricultural lands found out the remaining amounts of pesticides (bayleton, BI-58, insegar) in amounts below maximum possible concentrations, heavy metals (lead and copper) – higher maximum possible concentrations.

Research results showed that the remaining amounts of pesticides (RAP) and heavy metals (HM) rendered a complex citotoxicity effect showing up in the decline of mitotical index of cages of meristems of counterfoils of *Allium cepa* L.

Heavy metals and remaining amounts of pesticides render more expressed inhibition operating on frequency of mitosis in the cells of *A. cepa*, what separately being in an environment growing of plants heavy metals.

In the cells of root meristems of seed growing in soils, containing heavy metals only, there was forming of prophase block. Pollutants of soils of I zone (RAP+HM) induced forming of prophase-metaphasis block at the substantial decline of stake of anaphase and telophase. At the increase of maintenance of contaminants in soils of II and III of zone (RAP+HM) it was found out the reliable increase of percentage of metaphas at the decline of general amount of cells on the stage of prophase, anaphase and telophase. Thus, heavy metals in high concentrations together with the remaining amounts of pesticides, cause the expressed negative cytotoxicity affecting on *A. cepa* showing up in inhibition of mitotical activity of cells of root meristemes.

Keywords: mitosis, heavy metals, pesticides, *Allium cepa* L.

References

1. Gnyenko N.V., Kovalenko E.V., Chaban V.I., Klayvzo C.P. Some aspects of evolution of black earth at their protracted intensive agricultural use // Soil Science. – 1998. – № 6. – P. 732–738.
2. Abdurachmanova A.A. Mutagene action of the long-term bringing in soil of pesticides and mineral fertilizers on the seed of cotton plant and bow // The Genetic effects of anthropogenic contamination of environment in Zarafchans to the valley. Collection of scientific works. Samarkand: SamSU, 1989. – P. 20–26.
3. Uzunov K., Zacharieva V., Kolarova V., Dragostinova V., Uzunov I. Heavy metals (Mn, Pb, Zn, Cu) in soils and plants of the Sofia valley // Geochemistry and mineralogy. – 1996. – Vol. 31. – P. 103–123.

4. Butani J.V., Shukla P.T. Cytological effects of pesticides on onion (*Allium cepa* L.) root tip / Gujarat. Agr. Univ. Res. J. – 1994. – Vol. 20, № 1. – P. 60–65.
5. Arif M., Vahidy A. A. Toxicity of fungicides Nimrod and Dithane M-45 on mitotic cells of *Allium cepa* L. // Phillip. J. Sci. – 1996. – Vol. 125, № 4. – P. 271–289.
6. Priya E., Joyce S., Gowrishankar B., Rajaiah D. Genotoxic effect of an organophosphorous pesticide on *Allium* root meristems in vivo // Indian J. Exp. Biol. – 1996. – Vol. 34, № 4. – P. 320–324.
7. Ibragimova E.E. Ecological and phytotoxic estimation of contamination of agricultural soils of Crimea by pesticides and heavy metals // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, Chemistry. – 2007. – Vol. 20 (59). – № 2. – P. 16–25.
8. Pausheva Z.P. Practical work on cytology of plants. – М.: Ear, 1980. - 304 p.
9. Plochynckiy N.A. Biometrics. – М.: MSU, 1970. – 367 с.
10. Ewseeva T.I., Maysterenko T.A., Gerascin S.A., Bealuh E.S., Cazacova E.W. Toxic and cytogenetic effects induced at *A. cepa* by the subzero concentrations of Cd and ²³²Th // Cytology and genetics. – 2005. – № 5. – P. 73–80.

Поступила в редакцию 22.01.2014 г.