

Алёхина Г.П., Кнутарев Н.М., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В.
Влияние урбанизированных территорий на митотическую активность клеток
меристемы корней лука репчатого (*Allium cepa* L.)

.....
**Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»**
=====

УДК 574.24

**Влияние урбанизированных территорий на митотическую активность
клеток меристемы корней лука репчатого (*Allium cepa* L.)**

Алёхина Г.П., Кнутарев Н.М., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В.

Оренбургский государственный университет

Аннотация

*В статье изложены результаты использования цитогенетических методов в оценке воздействия урбанизированных территорий на митотическую активность клеток меристемы корня лука репчатого *Allium cepa* L. Исследования проводились на 4 участках, отличающихся антропогенной нагрузкой. В основе метода исследования *Allium test* и анализ значений митотического индекса клеток меристемы корня *Allium cepa* L. пророщенных на талой снеговой воде исследуемых точек. Проведенное исследование показало, что загрязнение урбанизированных территорий оказывает мутагенное воздействие, вызывая образование хромосомных aberrаций и других типов патологии митоза в клетках апикальной меристемы корней *Allium cepa* L.*

Ключевые слова: ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, МИТОТИЧЕСКИЙ ИНДЕКС, ALLIUM TEST, ЛУК РЕПЧАТЫЙ, УРБАНИЗИРОВАННЫЕ ТЕРРИТОРИИ

Введение

В настоящее время большое значение придается биологическим методам, проводящим прямой анализ токсичности объектов с использованием различных чувствительных организмов растений и животных без адаптивных возможностей в качестве объектов биотестирования [1].

Биологический мониторинг окружающей природной среды является одним из ключевых элементов в системе обеспечения экологической безопасности территорий, подверженных воздействию опасных производственных объектов. Комплекс биологических исследований такой системы состоит из экотоксикологического мониторинга, а также

Алёхина Г.П., Кнутарев Н.М., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В.

Влияние урбанизированных территорий на митотическую активность клеток

меристемы корней лука репчатого (*Allium cepa* L.)

.....
Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
=====

мониторинга животного и растительного мира.

Экотоксикологический мониторинг включает изучение токсичности компонентов природной среды методами биотестирования на объектах, принадлежащих к разным системным группам (культуры клеток, микроорганизмы, низшие растения, беспозвоночные), исследования генотоксичности и мутагенности загрязненных компонентов природной среды (генетический мониторинг) [2].

Мониторинг флоры и фауны включает изучение состояния растительных сообществ с использованием методов биоиндикации; изучение состояния репрезентативных видов высших животных по изменению их гематологических, биохимических и иммунологических показателей [3].

Трансформация экологически опасных загрязнителей в окружающей среде приводит к образованию, как правило, более устойчивых и трудно идентифицируемых соединений. Малые и сверхмалые дозы этих веществ, безопасные с точки зрения санитарно-гигиенических норм, могут оказать существенное влияние на экосистемы. Эти вещества чрезвычайно сложно идентифицировать стандартными методами количественного химического анализа, но их действие можно обнаружить биологическими методами [4].

Наиболее значимыми последствиями воздействия экотоксикантов являются изменения генетического материала, которые возникают на самых ранних этапах развития ответной реакции организма. Они могут приводить к сильным нарушениям в биохимических и физиологических процессах, а также передаются следующим поколениям.

Выявлением генотоксических веществ и слежением за их мутагенной активностью посредством наблюдения за реакциями специальных биоиндикаторных видов занимается цитогенетический мониторинг. Анализируемые цитогенетические характеристики (включают хромосомные aberrации, обмены сестринских хроматид, микроядра, ДНК-кометы и митотические аномалии) в настоящее время используются для выявления воздействия различных антропогенных факторов на организм [5].

Объекты и методы

Allium test — растительная тест-система для оценки мутагенного, митозмодифицирующего и токсического эффектов факторов химической и физической природы на основе растения *Allium cepa* L. — лук репчатый.

В современных исследованиях *Allium cepa* L. считается эталонным растительным тест-объектом для анализа мутагенности, митотоксичности и токсичности различных факторов.

В *Allium test* используются корешки проростков репчатого лука *Allium cepa* L., который впервые предложен Шведской королевской академией наук как стандартный тест-объект [6].

Allium test рекомендован экспертами ВОЗ как стандарт в цитогенетическом мониторинге окружающей среды, так как результаты, полученные на данном тесте, показывают корреляцию с тестами на других организмах: водорослях, растениях, насекомых, в том числе и млекопитающих, и человеке.

Митотический режим - совокупность количественных показателей, характеризующих митотическое деление клеток:

- а) показатель митотической активности, или митотический индекс;
- б) процентное соотношение делящихся клеток, находящихся на разных стадиях митоза;
- в) относительное количество всех патологических митозов, выраженное в процентах к общему числу митозов;
- г) относительное количество отдельных разновидностей патологий митоза, выраженное в процентах к общему числу митозов.

Таким образом, митотическая активность является одной из основных характеристик митотического режима клеток любого организма.

Показателем митотической активности является митотический индекс (MI), который выражается в процентах и рассчитывается по формуле:

$$MI = \frac{\text{число делящихся клеток}}{\text{общее число клеток на препарате}} \times 100\% \quad (1)$$

Иногда митотический индекс выражают в промиллях (‰) и тогда умножают не на 100, а на 1000.

Определяют процентное соотношение делящихся клеток, находящихся на разных стадиях митоза:

$$\frac{\text{доля клеток на стадии профазы}}{\text{общее число делящихся клеток}} = \frac{\text{число клеток на стадии профазы}}{\text{общее число делящихся клеток}} \times 100\% \quad (2)$$

Алёхина Г.П., Кнутарев Н.М., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В.
Влияние урбанизированных территорий на митотическую активность клеток
меристемы корней лука репчатого (*Allium cepa* L.)

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

Аналогично считают долю метафазных, анафазных, телофазных клеток.

Расчет различных типов МІ и определение долей делящихся клеток необходимы для регистрации времени прохождения клетками различных стадий митоза, выявления возможной задержки клеток на какой-либо стадии вследствие повреждения цитогенетических структур клетки под действием загрязняющих веществ.

Патологический митоз — нарушение нормального течения митоза, приводящее к возникновению хромосомных мутаций и неравномерному распределению хромосом между дочерними ядрами. Патологические митозы очень часто встречаются при различных экстремальных воздействиях, при некоторых патологических процессах, при воздействии на клетки химических соединений или радиационном поражении [7].

Для оценки действия антропогенных нагрузок как генетически активных факторов на биологический тест-объект *Allium cepa* L. был проведен отбор проб снега в соответствии с методикой ГОСТ17.1.5.05-85 [8] в следующих точках:

1. Пересечение улиц Терешковой и Рыбаковской в центре города Оренбурга с максимальной нагрузкой автотранспорта (Рис. 1А);
2. Оренбургский завод «Экокирпич» (Рис. 1Б);
3. Металлургический комбинат «Уральская сталь» город Новотроицк Оренбургской области (Рис. 2А);
4. Поселок Городище, пригород Оренбурга - контрольная точка (Рис. 2Б).

Отобранные пробы снега растапливались при комнатной температуре (20°C), далее на талой воде был пророщен лук репчатый (*Allium cepa* L.), изготовлены и микроскопированы препараты, по три образца на каждую точку.

Результаты и обсуждение

Преимуществом *Allium test* является его высокая чувствительность при оценке действия генетически активных факторов, даже если они присутствуют в сверхмалых дозах. *Allium test* позволяет оценить напряженность окружающей среды на момент обследования, прогнозировать отдаленные последствия действия факторов окружающей среды на биоиндикаторный вид *Allium cepa* и экосистему в целом.

Алёхина Г.П., Кнутарев Н.М., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В.
Влияние урбанизированных территорий на митотическую активность клеток
меристемы корней лука репчатого (*Allium cepa* L.)

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

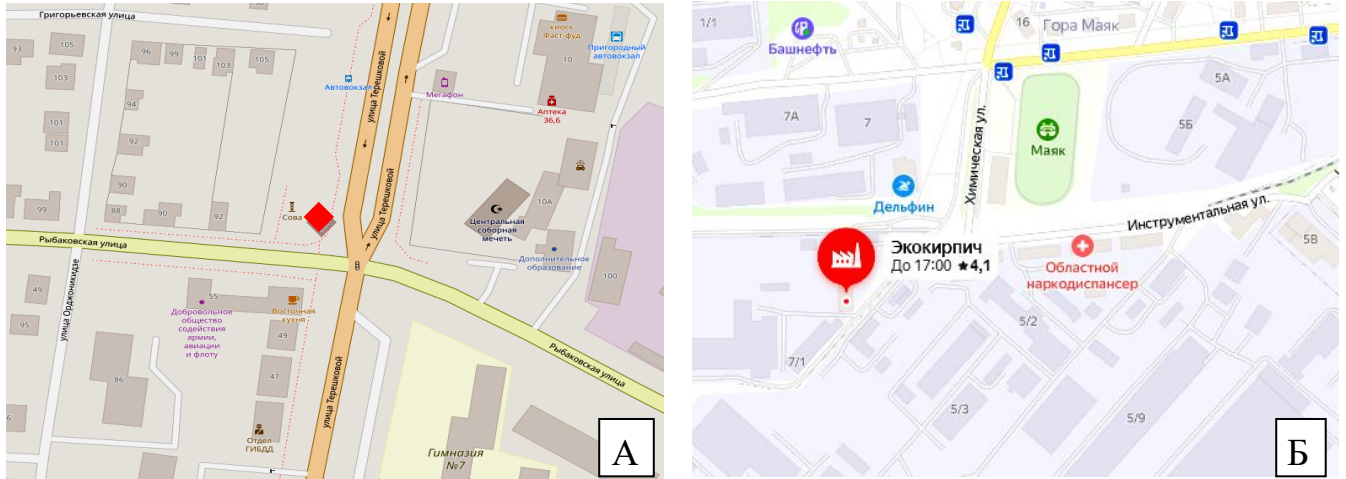


Рис. 1. Точки отбора проб снега: А - Пересечение улиц Терешковой и Рыбаковской; Б - Оренбургский завод «Экокирпич»

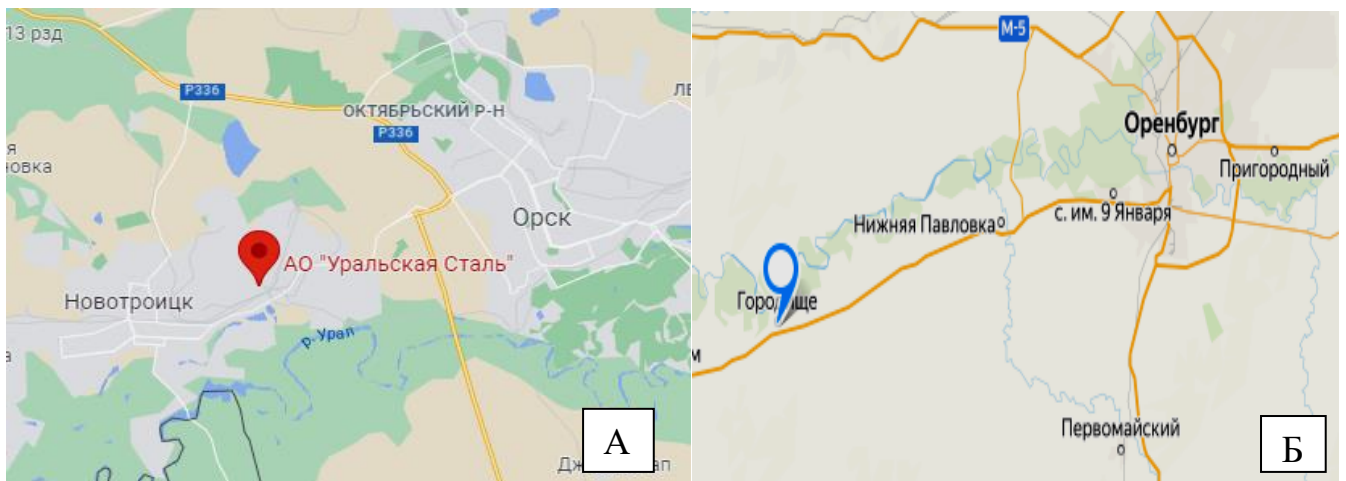


Рис. 2. Точки отбора проб снега: А - Metallurgical plant «Ural Steel»; Б - Поселок Городище (контрольная точка)

В ходе проведенных исследований были получены результаты, представленные в таблице 1.

Данные таблицы свидетельствуют о значительном превышении количества клеток в стадии профазы над клетками, пребывающими в других стадиях митоза. Вероятно, подобная картина характеризует неодинаковое время прохождения клетками той или иной стадии митоза и возможны задержки клеток на определенных стадиях вследствие повреждения цитогенетических структур клетки под действием загрязняющих веществ.

Таблица 1. Митотическая активность клеток *Allium cepa* L. по точкам исследования

№ препарата	Количество клеток						
	Профаза	Метафаза	Анафаза	Телофаза	Общее число делящихся клеток	Интерфаза	Всего
Оренбургский завод «Экокирпич»							
1	17	1	2	0	20	130	150
2	12	2	0	1	15	135	150
3	8	1	3	1	13	137	150
среднее	12,3	1,3	1,6	0,6	16	134	150
Перекресток улиц Терешковой и Рыбаковской							
1	3	1	1	0	5	145	150
2	3	3	2	1	9	141	150
3	5	4	0	3	12	138	150
среднее	3,6	2,6	1	1,3	8,6	141,3	150
Металлургический комбинат «Уральская сталь»							
1	6	0	2	2	10	140	150
2	2	2	0	0	4	146	150
3	3	0	0	0	3	147	150
среднее	3,6	0,6	0,6	0,6	5,6	144,3	150
Поселок Городище (контрольная точка)							
1	8	6	1	4	19	131	150
2	10	6	2	4	22	128	150
3	12	1	1	4	18	132	150
среднее	10	4,3	1,3	4	19,6	130	150

На основании полученных результатов был вычислен митотический индекс (MI) по формуле (1), данные представлены в таблице 2.

Анализ полученных препаратов показал не только нарушения в митотической активности клеток, но и наличие серьезных нарушений в течении митоза у тест-объекта *Allium cepa* L., такие как рассеивание хромосом в метафазе, образование хромосомного моста в анафазе. Эти нарушения митоза были отмечены в точках (Рис. 3, 4), испытывающих наибольшую антропогенную нагрузку - точка 1 (перекресток улиц Терешковой и Рыбаковской г. Оренбург) и точка 3 (вблизи металлургического комбината «Уральская сталь», г. Новотроицк).

Алёхина Г.П., Кнутарев Н.М., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В.
Влияние урбанизированных территорий на митотическую активность клеток
меристемы корней лука репчатого (*Allium cepa* L.)

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

Таблица 2. Митотический индекс клеток образовательной меристемы корней *Allium cepa* L., пророщенном на экспериментальных пробах

№ препарата	Число делящихся клеток	Общее число клеток	Митотический индекс (МИ)
1. Оренбургский завод «Экокирпич»			
1	20	150	13.33%
2	15	150	10%
3	13	150	8.67%
Среднее (\bar{x}_1)			10.67%
2. Перекресток улиц Терешковой и Рыбаковской			
1	5	150	3.33%
2	9	150	6%
3	12	150	8%
Среднее (\bar{x}_2)			5.78%
3. Металлургический комбинат «Уральская сталь»			
1	10	150	6.67%
2	4	150	2.67%
3	3	150	2%
Среднее (\bar{x}_3)			3.78%
4. Поселок Городище (контрольная точка)			
1	19	150	12.67%
2	22	150	14.66%
3	18	150	12%
Среднее (\bar{x}_4)			13.11%



Рис. 3. Рассеивание хромосом в метафазе. Точка 1 (перекресток улиц Терешковой и Рыбаковской, г. Оренбург)

Алёхина Г.П., Кнутарев Н.М., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В.
Влияние урбанизированных территорий на митотическую активность клеток
меристемы корней лука репчатого (*Allium cepa* L.)

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

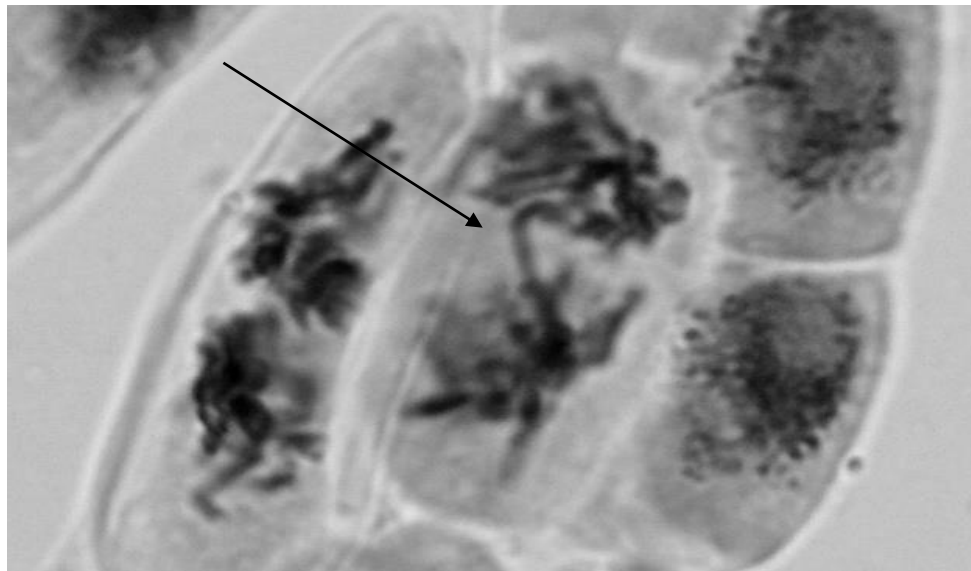


Рис. 4. Образование хромосомного моста в анафазе. Точка 3 (металлургический комбинат "Уральская Сталь" г. Новотроицк)

Заключение

Наиболее значимыми последствиями воздействия экотоксикантов являются изменения генетического материала, которые возникают на самых ранних этапах развития ответной реакции организма. Они могут приводить к сильным нарушениям в биохимических и физиологических процессах, а также передаются следующим поколениям.

В наших исследованиях наибольший митотический индекс (МИ), демонстрирует образец, выращенный на талом снеге с контрольной точки (п. Городище). Незначительно от него отстает образец, пророщенный на экспериментальных пробах, взятых вблизи завода "Экокирпич". Наименьший МИ показали клетки образовательной меристемы корней *Allium cepa* L. выращенные на пробах, взятых вблизи металлургического комбината "Уральская Сталь" города Новотроицк, за ним следуют значения митотического индекса клеток *Allium cepa* L. выращенных на снежных пробах взятых с перекрестка улиц Терешковой и Рыбаковской города Оренбурга.

Таким образом, среди отобранных проб заметное генотоксическое воздействие на митотический аппарат образовательной меристемы корней *Allium cepa* L. (об этом свидетельствуют наименьшие значения МИ) было отмечено в пробах снега отобранных на перекрестке улиц Терешковой и Рыбаковской в городе Оренбурге и вблизи металлургического комбината «Уральская сталь» в городе Новотроицке, что говорит о

Алёхина Г.П., Кнутарев Н.М., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В.
Влияние урбанизированных территорий на митотическую активность клеток
меристемы корней лука репчатого (*Allium cepa* L.)

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

повышенном уровне антропогенной нагрузки данных территорий.

Таким образом, загрязнение урбанизированных территорий генотоксикантами оказывает достоверное мутагенное воздействие, вызывая образование хромосомных aberrаций и других типов патологии митоза в клетках апикальной меристемы корней *Allium cepa* L.

Список использованных источников:

1. Biobasics: bioindicatorrrs [Электрон. ресурс]. – Режим доступа: <https://web.archive.org/web/20111003162258/http://www.biobasics.gc.ca/english/View.asp?x=740>
2. Алехина Г.П., Хардикова С.В., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В. Биоиндикация качества атмосферного воздуха по состоянию хвои *Pinus sylvestris* L. в условиях города Орска Оренбургской области // АгроЭкоИнфо, 2021. - № 2. - С. 1-8.
3. Artiola J.F., Brusseau M.L. The Role of Environmental Monitoring in Pollution Science // Environmental and Pollution Science (Third Edition). – Oxford: Academic Press. - 2019. – С. 149–162.
4. Хотько Н.И., Дмитриев А.П. Биомониторинг окружающей среды в районах размещения опасных промышленных объектов. Теория и практика. – Саратов: ГосНИИЭНП, 2015. – 184 с.
5. Козак М.Ф., Марченко Н.В. Цитогенетические эффекты воздействия антропогенного загрязнения вод нижней Волги: монография. – Астрахань: Астраханский университет, 2008. – 116 с.
6. Alliumtest [Электрон. ресурс]. – Режим доступа: <https://web.archive.org/web/20071225193800/embryo.ib.amwaw.edu.pl/invittox/prot/8.htm>.
7. Архипчук В.В., Романенко В.Д., Архипчук М.В. Цитогенетический метод определения влияния пороговых величин антропогенных факторов на геном растений и животных // Доклады Академии наук. - 1992. – Т. 326. - № 5. – С. 908-910.
8. ГОСТ 17.1.5.05-85. Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков. - М.: Изд-во стандартов, 1985. – 12 с.

Цитирование:

Алёхина Г.П., Кнутарев Н.М., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В. Влияние урбанизированных территорий на митотическую активность клеток меристемы корней лука репчатого (*Allium cepa* L.) [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2022. – № 2. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2022/2/st_201.pdf. DOI: <https://doi.org/10.51419/202122201>.