

УДК 576.354.4+504. 5+504.06.

К ВОПРОСУ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ПРИ МОНИТОРИНГЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

И. С. ПОПОВА

Институт цитологии и генетики СО РАН
Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10
e-mail: kinjiru@ngs.ru

При экологическом мониторинге предлагается использовать не только количественные, но и определенные качественные критерии оценки "правильности" мейоза при микроспорогенезе: по результатам анализа стадии тетрад, а также пыльцы. Это существенным образом может сократить время и цитологического анализа, и принятия решений. Предлагается путь увеличения числа растений – биоиндикаторов природной среды.

Ключевые слова: внешняя среда, цитологический мониторинг, микроспорогенез, стадия тетрад, пыльца.

Физиолого-генетическая нестабильность растений показана в работах по экспериментальному радиационному и химическому воздействию. В числе других критериями повреждений служат аберрации, возникающие в первом митозе корешков прорастающих семян: в первую очередь – хромосомные и хроматидные мосты с фрагментами и без фрагментов. В митозе травянистых растений [1] и деревьев хвойных пород [2 – 4], находившихся под антропогенной нагрузкой, помимо формирования мостов, были выявлены такие нарушения, как пикноз, лизис, фрагментация хромосом, формирование кольцевых и дицентрических хромосом, С-митозы, эндополиплоидия, миксоплоидия и другие аномалии.

В текущее время при мониторинге окружающей среды все большее внимание стали уделять анализу мейоза при микроспорогенезе. У вики (*Vicia cracca* L.), произраставшей в пределах действующей высоковольтной линии электропередач, вдоль автотрассы с интенсивным движением, в районе нефтехимического завода, в зоне радиоактивного загрязнения наблюдался относительно стандартный набор нарушений, представленных хромосомными перестройками, аномалиями веретена деления и повышением стерильности пыльцы [5]. В работе [6] оценивалась реакция селекционных сортов на отдельные факторы агротехнологий (плодородие почвы, система удобрений, защита растений) и на их совместное воздействие на растения. Анализ мейоза выявил существенное повышение частоты аномальных тетрад по сравнению с контролем. Мейоз при микроспорогенезе использовали для оценки качества питьевой воды [7], суммарной мутагенной активности факторов, загрязняющих окружающую среду [8], последствий выбросов промышленных предприятий [9] и в других ситуациях.

По определению система мониторинга не является управляющей: ее задача – дать по возможности быстрый и правильный ответ на поставленные вопросы. Понятно, что решению задачи, с одной стороны, способствует выбор растительных объектов, чувствительных к экстремальным ситуациям, а с другой – признаков, достаточно информативных и удобных в процессе экспресс-анализа.

Спектр мейотических аномалий предложено делить на неспецифические и специфические. Неспецифические аномалии “являются закономерным классом аномалий у всех генетически несбалансированных форм (отдаленных гибридов, гаплоидов, полиплоидов и др.) [10, с. 126]. Они могут быть следствием нарушения морфогенеза генеративных органов, нарушений развития тапетума, точности осуществления метаболических процессов, предшествующих мейозу [10, с. 111]. Судя по данным литературы, следствием загрязнения окружающей среды являются преимущественно неспецифические аномалии.

И. Голубовская отметила, что типы мейотических мутаций эукариот, встретившиеся в природе и опыте, поражают своим единообразием. “Закон гомологических рядов, сформулированный Н.И. Вавиловым в 1922 году, находит свое нагляднейшее подтверждение в мейотических мутациях, охватывающих все царство эукариот от низших грибов до высших цветковых растений и млекопитающих, включая человека” [11, с.101]. Нечто аналогичное можно утверждать и в отношении неспецифических аномалий.

Однако природа понятия “специфичность – не специфичность” является двойственной; неспецифические в принципе, те или иные аномалии могут стать специфическими в зависимости от цитогенетических особенностей объекта. Подтверж-

дением этому служат уровень и спектр нарушений на стадии тетрад, зависящий от продолжительности и образа жизни, системы размножения и от положения вида в иерархической системе цветковых растений.

Стадия тетрад мейоза относительно проста для анализа, при этом аномалии возникают под воздействием и генетических, и средовых факторов. Знание некоторых особенностей проявления аномалий на этой стадии может способствовать ускорению анализа экологической ситуации, а также повышению достоверности данных за счет увеличения объема исследуемого материала. Не исключая так называемые физиологические аномалии (лизис, пикноз хромосом и другие), отметим, что нарушения на стадии тетрад проявляются, главным образом, через формирование МКП с разным числом дочерних клеток [12], в том числе полиад, а также тетрад с тем или иным числом микроядер.

Описано несколько способов формирования полиад. Назовем некоторые из них. Считают, что у исходных видов и некоторых гибридов F-1 рода *Ribes* L. частота полиад предопределяется количеством МКП с отставшими и дезориентированными хромосомами на стадии анафаза-I, при этом второе деление мейоза может совершаться по типу митоза [13]. Известна аномалия “расщепленное веретено” (“split spindle” [14]). Суть аномалии заключается в разделении на две части веретена деления с образованием двойной метафазной пластинки – в клетках соматической ткани, либо в первом делении мейоза. Предполагается, что в соматической ткани эта аномалия ведет к формированию клеток с варьирующим числом хромосом, а в генеративной – к формированию полиад. Расщепление веретена чаще ведет к формированию “классических” пентад

и гексад, которые наблюдаются в мейозе и однодольных, и двудольных растений. Предполагается, что расщепление веретена может быть обусловлено (в том числе) влиянием генов асинопсиса [15] и десинапсиса (цит. по [16]).

Исследуя полиплоидные виды рода *Rubus*, М. Томпсон [17] обнаружил три одновременно действующих механизма: расщепление веретена, нерасхождение и неравное расхождение хромосом в анафазе-I и II. Для обозначения комплекса аномалий, которые вели к формированию полиад, он предложил термин “разделение комплемента” – “complement fractionation”. Формировались полиады с 2-12 микроспорами, но преобладающими были шестиклеточные образования.

Однако формирование полиад наблюдается и тогда, когда мейоз протекает относительно “правильно”. Анализируя аутотетраплоидную сахарную свеклу, Н. Босмарк [18] обратил внимание на то, что полиады формируются существенно чаще того их количества, которое можно было бы ожидать исходя из частоты аномалий аппарата веретена и/или цитокинеза на предыдущих стадиях мейоза. Он высказал идею, что избыточные дочерние клетки возникают путем фрагментации молодых ядер в телофазе II. Разделение ядер происходит способом, весьма напоминающим амитоз. Предполагалось также, что фрагментация ядер в телофазе II и образование дополнительного числа дочерних клеток вызвано нарушениями образования фрагмента и клеточных стенок между четырьмя образовавшимися ядрами. Возможно, имеются какие-то нарушения мейоза, способствующие этому процессу. Н. Босмарк назвал эту аномалию постмейотической фрагментацией ядер (“post-meiotic nuclear fragmentation”). Частота полиад и число микроспор в пределах полиады изменчивы

и зависят, очевидно, от особенностей экспериментального материала и условий внешней среды. Наш опыт анализа тетраплоидного гороха показал, что порою в полиаде насчитывалось до 17 микроспор [19]. У тетраплоидной ржи одна из аномалий была обозначена нами как “ложная пентада” – клеточной перегородкой отделялась одна-две отставших и/или дезориентированных хроматиды (хромосомы) [19]. Очевидно, имеется критическая масса хроматина, которая только и может дать начало отдельной клетке. Но обсуждая возможный механизм формирования полиад у двудольных, Н. Шамина высказала предположение, что максимальное число клеток-членов полиады у двудольных – теоретически может равняться числу хромосом [12].

Для целей биоиндексации существенно то, что формирование полиад по причине “постмейотической фрагментации” наблюдается, главным образом, у видов растений с симультанным типом деления МКП. Это: экспериментально созданные аутотетраплоиды [20 – 22], отдаленные гибриды [13]), мутант № 231 у *Pisum sativum* L [23], дикорастущие виды рода *Cornus* [24] и другие виды двудольных, испытавших то или иное воздействие стресса. Подчеркнем, что полиады редко наблюдаются в мейозе растений с сукцессивным типом деления МКП – по крайней мере, в семействе *Poaceae* – даже в тех случаях, когда выявляется очень высокий уровень аномалий в мейозе. В этом семействе нарушения в мейозе (помимо лизиса, пикноза и др.) проявляются, главным образом, через формирование тетрад с тем или иным количеством микроядер. Кстати, такие аномалии, как лизис и пикноз хроматина, интенсивный цитомиксис также могут быть следствием неблагоприятной экологической ситуации.

В семействе *Poaceae* может представлять интерес еще один относительно простой и информативный признак мейоза. На стадии метафаза-I достаточно легко идентифицируются униваленты, формирующиеся за счет дезориентированных и / или преждевременно разошедшихся хромосом. Как правило, униваленты располагаются на периферии клетки – вне метафазной пластинки.

Антропогенные загрязнения среды ведут к повышению стерильности пыльцы и изменению размеров пыльцевых зерен [4, 8]. Опыт анализа экспериментально созданных форм показал, что у однодольных ветроопыляемых растений изменения в пыльце проявляются преимущественно через изменение размеров пыльцевых зерен и числа ростовых пор. У двудольных – самоопылителей и перекрестно размножающихся видов, помимо изменения числа ростовых пор, нередко изменяется и форма пыльцевых зерен. У видов растений из семейств *Papilionaceae*, *Umbelliferae*, *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae* и др. одновременно с нормальной эллипсоидальной была выявлена трех – и четырехугольная пыльца. Выполнено подробное описание и классификация морфотипов пыльцевых зерен [20]. Отметим, что частота пыльцевых зерен измененной формы варьирует порою в широких пределах. Изучив 10970 пыльцевых зерен у 35 растений тетраплоидного гороха, мы обнаружили 47,1 % пыльцевых зерен нестандартной формы. Изменчивость между растениями составила 0,2 – 82%. В сортопопуляциях, так или иначе выраженный, всегда присутствует “фон” неспецифических аномалий [25]. Однако у диплоидного гороха в нормальных условиях пыльцевые зерна измененной формы нами не наблюдались.

Перечисленные аномалии оценивают “качество” мейоза. Скажем, если в мейо-

зе вида-индикатора из класса двудольных будут одновременно наблюдаться полиады, изменение формы пыльцевых зерен и увеличение числа ростовых пор, это однозначно может свидетельствовать о влиянии на вид некоторой “нештатной” ситуации, в том числе и экологической. Поскольку метеорологические условия порою оказывают существенное влияние на мейоз, следует учитывать весь комплекс условий окружающей среды. Для разграничения “фона” неспецифических аномалий и последствий антропогенных нагрузок на природу, необходимо знание цитогенетических особенностей анализируемого вида.

Все растения в той или иной мере реагируют на загрязнение окружающей среды. Известно, однако, что лишайники и мхи являются одними из наиболее чувствительных биоиндикаторов. Биотест – частота микроядер в тетрадах при микроспорогенезе у традесканции (тест “Trad-MCN”) в восьми лабораториях США, Канады и Китая, контролирующей питьевую воду, остается более или менее константным: от 3 до 7 микроядер на 100 тетрад. При повышении концентрации хотя бы одного химического вещества, например, хлора, частота микроядер на 100 тетрад увеличивалась в пять и более раз [7]. Высокой чувствительностью к загрязнению внешней среды характеризуются волоски тычиночных нитей традесканции [8] и меристема первичных корешков у *Allium cepa* L. [26].

Экологи полагают, что у деревьев слабо развит гомеостаз и в неблагоприятной среде сильнее выражено несоответствие между фотосинтетическим аппаратом и потреблением его продукции, проявляющееся в нарушениях морфологических и физиолого-биохимических признаков. Хвойные деревья, как биоиндикаторы, интересны тем, что, во-первых, пригодны

для круглогодичных наблюдений и, вторых, характеризуются повышенной чувствительностью к промвыбросам. По мнению авторов [2 – 4, 9] хвойные деревья аккумулируют техногенные воздействия и реагируют на них повышением уровня нарушений в мейозе. В пробах с территорий, загрязненных выбросами промышленных предприятий (металлургические комбинаты Башкортостана и Челябинской области) уровень аномалий в мейозе в 7–10 раз превышал контрольные популяции [3]. Дж. Вудвелл [27] сообщил, что в сосново-дубовом лесу вблизи Национальной лаборатории в Брукхэвене (США) в результате длительного гамма-излучения вначале повредились, а затем погибли сосны и другие деревья, потом кустарники и, наконец, осоки, злаки и разнотравье. В окрестностях Лос-Анжелеса от смога гибли, в первую очередь, сосны. Чрезвычайную остроту приобрели исследования повреждающего действия радионуклидов на древесные растения (сосна обыкновенная) и другие организмы после аварии на Чернобыльской АЭС [28].

В текущее время огромный интерес вызывает вопрос о расширении списка растений, которые могли бы служить надежными биоиндикаторами природной среды. Но динамика влияния техногенных загрязнителей на мейоз растений изучена недостаточно. Для создания новых тест-систем необходимы наиболее полные представления о спектре неспецифических аномалий в мейозе, индикационной значимости той или иной аномалии мейоза у того или иного вида растений; о ее “фоновой” выраженности, и, наконец, о динамике повреждающих эффектов на мейоз. Это позволит использовать в системе мониторинга не один-два, а блок растительных объектов и вести “перекрестный” анализ возникшей экологической ситуации. Думается, что отправной точкой для этого

направления исследований может служить обширный опыт цитогенетического анализа форм растений, созданных экспериментально: путем удвоения числа хромосом, скрещивания генетически и/или географически различающихся видов растений, структурных реорганизаций хромосом, изменения фенотипического облика растения (дефолиация) и так далее. Наш опыт показывает, что в мейозе аутотетраплоидной озимой ржи, защищенные двойным набором хромосом и эндогенной изменчивостью признаков, проявляются фенкопии многих известных меймутантов эукариот и все многообразие неспецифических аномалий [19]. В этом смысле опубликованные данные по цитогенетическому анализу одних только экспериментально созданных аутотетраплоидов разных видов растений являются хорошей школой познания широкого спектра “видимых” нарушений мейоза и особенностей проявления неспецифических аномалий.

Список литературы

1. Grant W.F. Chromosome aberration in plants as a monitoring system. // Environ. Health perspect. – 1978. – Vol. 27. – P. 37–43.
2. Калашник Н.А., Лихонос Т.А., Ясowieва С.М. Генетическая характеристика состояния насаждений сосны обыкновенной на Южном Урале / “Актуальные проблемы генетики”. Материалы 2-й конференции Московского общества генет. и селекционеров. – М.: 20–21 февраля 2003. – Изд. МСХА. – Т. 2. – С. 287–288.
3. Калашник Н.А., Преснухина Л.П., Лихонос Т.А., Ясowieва С.М. Индикация загрязнения окружающей среды с использованием цитогенетических методов / III съезд ВОГИС. – М.: 6–12 июня 2004. – Т. 1. – С. 454.
4. Носкова Н.Е., Третьякова И.Н. Микроспорогенез и формирование мужского гаметофита сосны обыкновенной в усло-

- виях экологического стресса / III съезд ВОГИС. – М.: 6–12 июня 2004. – Т. 2. – С. 266.
5. Бондарь Л.М., Частоколенко Л.В. Микроспорогенез как один из возможных биоиндикаторов загрязняющего воздействия автотранспорта // Науч. докл. высш. школы, биол. науки. – 1990, № 5. – С. 79–83.
 6. Цаценко Л.В. Многоуровневый генетический скрининг агрокультур / III съезд ВОГИС. – М.: 6–12 июня 2004. – Т. 1. – С. 465.
 7. Ma Te-Hsiu, Anderson V.A., Harris M.M., Neas R.E., Lee Tze-San. Mutagenicity of drinking water detected by *Tradescantia* micronucleus test // Can. J. Genet. and Cytol. – 1985. – Vol. 27, N 2. – P. 143–150.
 8. Погосян В.С., Агаджанян Э.А., Хачатрян Н.К. Применение комплекса растительных тест-систем при оценке мутагенного действия производственных загрязнителей воздуха / V съезд ВОГИС. – М.: 24–28 ноября 1987 – Т. IV, ч. 2. – С. 90.
 9. Шкарлет О.Д. Влияние загрязнения среды на ход мейоза в материнских клетках пыльцы сосны обыкновенной / III съезд ВОГИС. – Л.: 16–20 мая 1977. – Т. I, ч. 3 – С. 592.
 10. Смирнов В.Г., Соснихина С.П. Генетика ржи. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1984. – 263 с.
 11. Голубовская И.Н. Мейотические мутации – нагляднейшее доказательство универсальности закона гомологических рядов Н.И. Вавилова / V съезд ВОГИС. – М.: 24–28 ноября 1987. – Т. IV, ч. 1. – С. 101.
 12. Шамина Н.В. Диагностикум аномалий растительного мейоза по его продуктам // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 486–494.
 13. Якобсон Л.Я. Исследование мейоза у некоторых видов и гибридов *Ribes L.* // Цитология и генетика. – 1974. – Т. 8, № 1. – С. 61–67.
 14. Ригер Р., Михаэлис А. Генетический и цитогенетический словарь. – М.: Колос, 1967. – 607 с.
 15. Jonston S.A., Ruhde R.W., Ehlenfeldt M.K., Hanneman R.E. Inheritance and microsporo-genesis of a synaptic mutant (sy-2) from *Solanum commersonii* Dum. // Can. J. Genet. and Cytol. – 1986. – Vol. 28, N 4. – P. 520–524.
 16. Голубовская И.Н. Генетический контроль поведения хромосом в мейозе / Цитология и генетика мейоза. – М.: Наука, 1975. – С. 212–343.
 17. Thompson M.M. Cytogenetics of *Rubus*. III. Meiotic instability in some higher polyploids // Amer. J. Bot. – 1962. – Vol. 49, N 6. – P. 575–582.
 18. Bosemark N.O. Post-meiotic nuclear fragmentation and pollen sterility in autotetraploid sugar beet // Hereditas. – 1967. – Vol. 57, N 1-2. – P. 217–238.
 19. Шумный В.К., Попова И.С., Владимиров Н.С. Тетраплоидная рожь в Сибири / Генетические методы в селекции растений. – Новосибирск: Наука, 1992. – С. 62–113.
 20. Joshi S., Rachuvanshi S.S. Polyploidy and Pollen variability in *Pimpinella monoecia* // Biol. Plant (Praha). – 1966. – S. 4. – P. 281–287.
 21. Eskilsson L. Studies on the use of induced autopolyploidy in the breeding of red clover. I. The relation between meiosis and pollen fertility in tetraploid red clover // Z. Pflanzenzüchtg. – 1971. – Bd. 66. – P. 221–234.
 22. Довженко Л.И. Возможные пути применения отбора по мейозу в селекции тетраплоидной гречихи // Fagorum. – 1988. – Vol. 8. – P. 64–78.
 23. Klein H.D., Baquar S.R. Genetically controlled chromosome breakage and reunions in the meiosis // Chromosoma (Berl.). – 1972. – Vol. 37. – P. 223–231.
 24. Clay S.N., Nath J. Cytogenetics of some species of *Cornus* // Cytologia. – 1971. – Vol. 36, № 4. – P. 716–730.
 25. Фадеева Т.С., Шнайдер Т.М. Изменчивость мейоза в связи с системой размножения вида / Цитогенетика зерновых культур. – Таллин: АН Эстонии, 1990. – С. 140–148.
 26. Фединяк А.В., Боднар Л.С., Дуган А.М., Барилляк И.Р. Генетические эффекты поверхностных и подземных вод Львовщины и коррекция мутагенных фонов природными и синтетическими сорбентами // Вісник Укр. товар. генет. і селекціонерів.–2005. – Т. 3, №1 -2. – С. 26–35.

27. Вудвелл Дж. Круговорот энергии в биосфере // Биосфера. – М.: Мир, 1972. – С. 41–60.
28. Сидоров В.П. Продленный мутагенез и морфогенез у растений при действии радиации, алкилирующих мутагенов и гербицидов// Автореф. дисс. д.б.н.. – Москва: МГУ, 1992. – 53 с.

Представлена М.А. Пилинской
Поступила 25.08.2009

ДО ПИТАННЯ ПРО ВИКОРИСТАННЯ
ЦИТОЛОГІЧНИХ ОЗНАК ПРИ МОНІТОРИНГУ
НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

І.С. Попова

Інститут цитології і генетики СВ РАН
Росія, 630090, м. Новосибірськ,
пр. ак. Лаврентьєва, 10
e-mail: kinjiru@ngs.ru

При екологічному моніторингу пропонується використовувати не тільки кількісні, але й певні якісні критерії оцінки “правильності” мейозу при мікроспорогенезі: за результатами аналізу стадії тетрад, а також пилку. Це істотно може

скоротити час і цитологічного аналізу, і прийняття рішень. Пропонується шлях збільшення числа рослин – біоіндикаторів природного середовища.

Ключові слова: зовнішнє середовище, цитологічний моніторинг, мікроспорогенез, стадія тетрад, пилка.

CYTOLOGY SIGNS IN ESTIMATION OF PLANT
REACTION ON STRESS

I. S. Popova

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS
Russia 630090, Novosibirsk, Prospekt
Lavrentyeva 10
e-mail: kinjiru@ngs.ru

The stage of tetrad in meiosis of microsporogenesis and the pollen are characterized by certain forecasting abilities and can be used for express-estimation of antropogenic pressure upon the environment.

Key words: external environment, cytological monitoring, microsporogenesis, stage of tetrads, pollen.