

Васильев Денис Владимирович, К.Б.Н., С.Н.С.,
НИЦ «Курчатовский институт» – ВНИИРАЭ

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО И РАЗДЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ И СВИНЦА НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ ПРОРОСТКОВ СЕМЯН СОСНЫ

Аннотация. Показано, что γ -облучение снижает всхожесть и дружность прорастания семян, а нитрат свинца в концентрации 2% способен её повышать. γ -облучение и свинец, как по отдельности, так и совместно ведут к увеличению частоты цитогенетических нарушений, но совместное их применение за счет эффекта антагонизма не вызывает более высокую частоту нарушений чем при раздельном действии генотоксичных факторов.

Ключевые слова: Сосна, семена, свинец, хромосомные нарушения.

Техногенное загрязнение окружающей среды представляет собой одну из наиболее острых экологических проблем, оказывающую существенное негативное воздействие на хвойные растения. В условиях интенсивной антропогенной нагрузки, вопросы сохранения и восстановления хвойных насаждений и лесных экосистем приобретают первостепенное значение для поддержания экологического баланса и устойчивого функционирования природных систем. Сосна, как эдификатор, играет ключевую роль в формировании структуры и функциональной активности биоценозов, и ее нормальное развитие является важным фактором поддержания стабильности экосистем. Однако генеративная сфера сосны обыкновенной (*Pinussylvestris* L.) проявляет высокую восприимчивость к ионизирующим излучениям и химическим загрязнителям, что может приводить к значительным поражениям экосистем.

Целью работы было изучение влияния нитрата свинца ($Pb(NO_3)_2$) и γ -облучения на семена сосны обыкновенной (*Pinussylvestris* L.).

Материалы и методы.

Исследовалось влияние γ -излучения и $Pb(NO_3)_2$ на семена сосны обыкновенной (*Pinussylvestris* L.).

В эксперименте было 4 варианта: контроль – необлученные семена замачивались дистиллированной водой; вариант, где семена облучались перед замачиванием в дистиллированной воде; вариант в котором облученные семена замачивались в 2%-ном растворе $Pb(NO_3)_2$ и вариант где семена облучались перед замачиванием в 2%-ном растворе $Pb(NO_3)_2$.

Семена облучали дозой 20 Гр (мощность дозы 60 Гр/ч) на установке ГУР-120 (^{60}Co). $Pb(NO_3)_2$ вносили в чашки Петри в виде раствора (концентрация Pb – 2%) во время раскладки семян для проращивания.

Семена выращивались в чашках Петри на фильтровальной бумаге. Чашки с семенами во время проращивания находились в термостате MIR-253 («Sanyo», Япония) при постоянной температуре 24 °C.

В ходе проращивания оценивалась всхожесть семян на 20 день и дружность прорастания семян как среднее число прорастающих семян за 7 дней.

Для того чтобы зафиксировать клетки в первом митозе отбирались проросшие корешки длиной 0,5 – 1 см.

Для фиксации использовался ацето-алкоголь (1:3). Препараты хранились в холодильнике при температуре +4°C. Из зафиксированных корешков готовились временные давленные препараты, которые окрашивались ацетоорсеином. В препаратах определяли число клеток с нарушениями целостности хромосом и процесса деления клеток.



Для оценки количественной меры отклика биологической системы на комбинированное воздействие факторов физической и химической природы использовался коэффициент взаимодействия, рассчитываемый по формуле [1]:

$$Kw = \frac{\Delta A (\gamma, TM)}{\Delta A (O, TM) + \Delta A (\gamma, O)}, \quad (1)$$

Где $\Delta A (\gamma, TM) - A (O, O)$ – инкремент (значение показывающее превышение размера индуцированного стрессовыми факторами показателя над его размером в контроле) при дозе ионизирующего излучения γ и концентрации тяжелого металла – ТМ. Для классификации отклика биологической системы на комбинированное действие проверялась статистическая гипотеза о равенстве Kw единице. Если $Kw \sim 1$, то результат комбинированного действия классифицировался как аддитивный; если Kw достоверно меньше 1, то, как антагонизм; если Kw достоверно больше 1, то как синергический эффект комбинированного действия.

Анализировали все ана-телофазные клетки. Клетки, имеющие сложные, (неподдающиеся распознаванию) абберации из анализа исключались. Статистический анализ проводили в редакторе MS Excel 2019 и Statistica 10 методами вариационной статистики. С целью оптимизации объема выборки применялась методика статистического анализа эмпирических распределений [2]. Статистическая значимость отличий оценивалась с помощью критерия Стьюдента. Экспериментальные данные проверялись на наличие нормального распределения в соответствии с непараметрическим критерием Колмогорова–Смирнова и на наличие выбросов в соответствии с Q-критерием Диксона.

Результаты исследования.

Полученные результаты выявили тенденцию к снижению всхожести семян сосны после γ -облучения. Проращивание семян в двухпроцентном растворе нитрата свинца вызвало рост всхожести у семян сосны. Совместное воздействие свинца и γ -облучения на семена не вызвало значимого изменения их всхожести (рисунок1) по сравнению с контролем. При этом коэффициент взаимодействия $KW = 0.13$, что свидетельствует об антагонистическом эффекте комбинированного действия свинца и γ -облучения.

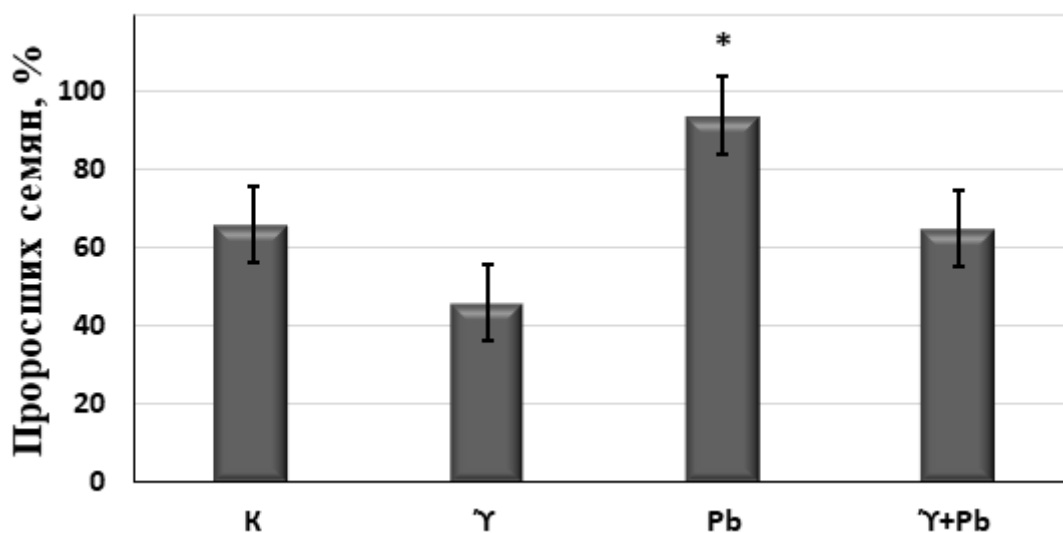


Рис. 1. Всхожесть семян сосны, %. Примечание: * – отличие от контроля (К) является статистически значимым при: $p < 0.05$.

Аналогичные результаты были получены и по показателю дружности прорастания семян (рисунок2), показывающему среднее число проросших семян за один день [3].



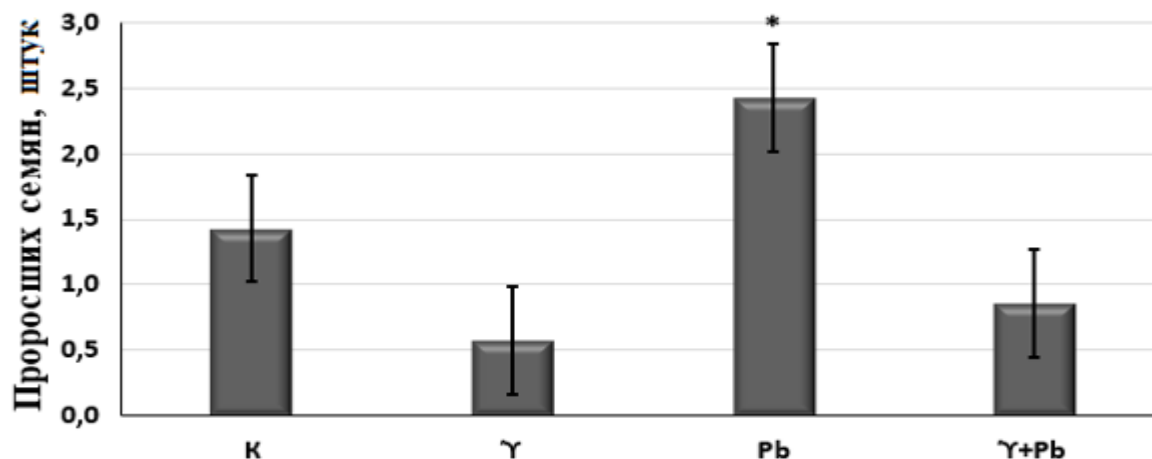


Рис. 2. Дружность прорастания семян сосны. Примечание: * – отличие от контроля (К) является статистически значимым при: $p < 0.05$.

Свинец и γ -излучение как отдельно, так и совместно взаимодействуя с ДНК, способны индуцировать перестройки и мутации, частично подавлять системы репарации [1]. Результаты исследования влияния γ -облучения и свинца на частоту цитогенетических нарушений в корневой меристеме проростков семян сосны выявили статистически значимое увеличение частоты цитогенетических аномалий у проростков семян как при раздельном воздействии γ -излучения и свинца, так и при сочетанном воздействии свинца с γ -излучением (рисунок 3).

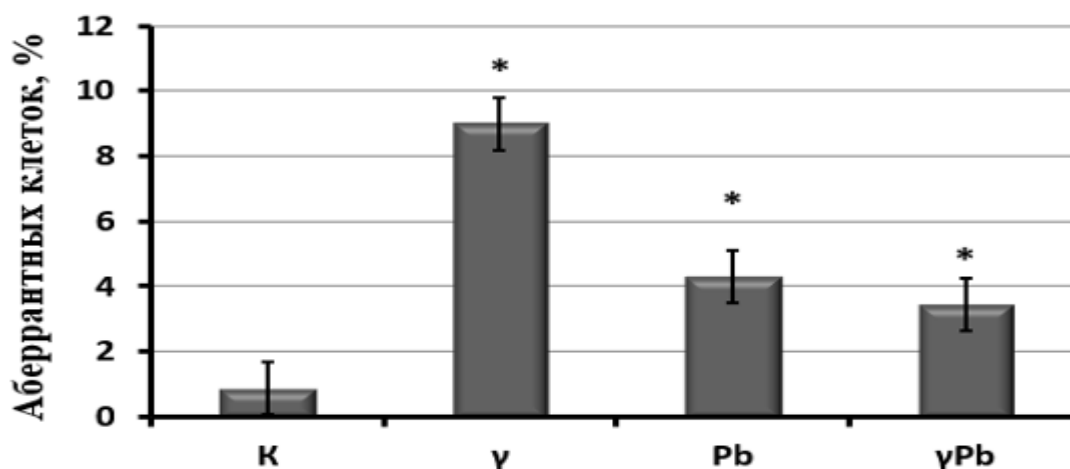


Рис. 3. Частота цитогенетических нарушений. Примечание: * – отличие от контроля (К) является статистически значимым при: $p < 0.05$.

Причем частота аномалий при комбинированном воздействии излучения со свинцом не выше, чем при отдельном воздействии γ -излучения. Коэффициент взаимодействия = 0,22 что свидетельствует об антагонистическом эффекте комбинированного действия свинца и γ -облучения.

Важной задачей является определение природы основного действующего генотоксичного фактора. При проведении цитогенетических исследований сделать предположение о природе фактора вызвавшего повышение частоты аберраций можно по спектру нарушений. Этот подход основан на том факте, что хотя ни один из техногенных поллютантов не способен создать новые биологические феномены, (т.е. новые типы мутаций, которые не наблюдались бы и в контроле), но соотношение типов мутаций при действии факторов разной природы может меняться весьма



значительно [4]. Считается, что тяжелые металлы и в частности Рb способны в большей мере увеличивать долю патологий связанных с повреждением митотического аппарата в результате чего происходит неправильное расхождение хромосом к полюсам при делении клеток. Для ионизирующих излучений считаются более характерными тяжелые нарушения структуры хромосом, приводящие к появлению большого числа парных фрагментов и мостов (рисунок4) [5].

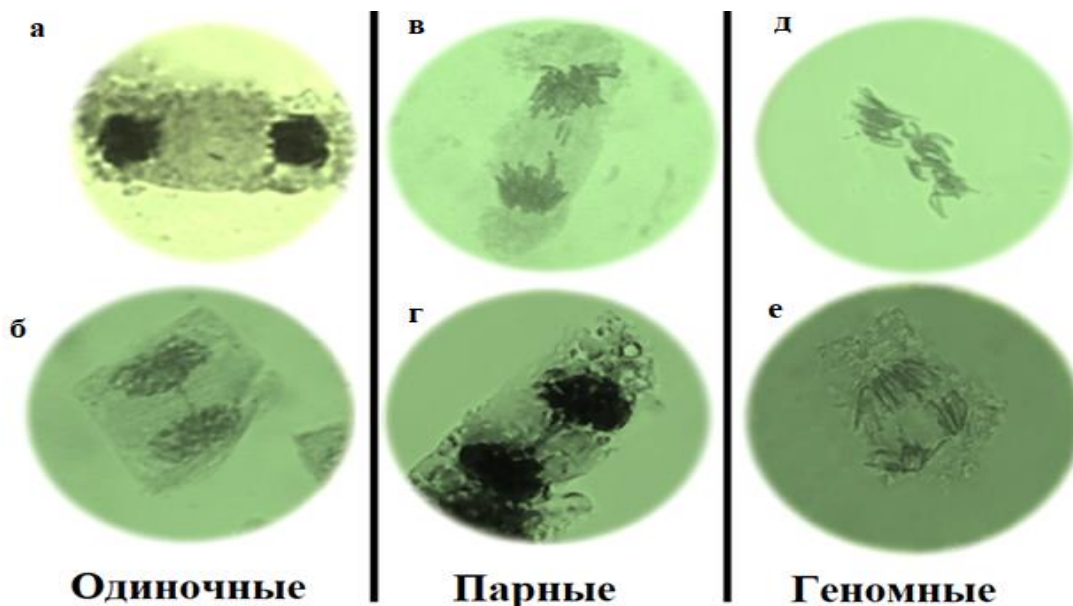


Рис.4. Спектр цитогенетических нарушений. Пояснение: а – одиночный фрагмент; б – одиночный мост; в парный фрагмент; г – парный мост; д – не расхождение части хромосом; е – мультиполярный митоз.

Проведенный анализ спектра нарушений действительно показал статистически значимо большую по сравнению с контролем частоту парных нарушений при γ -облучении семян и высокую частоту геномных aberrаций при воздействии свинца. При комбинированном воздействии γ -облучения и свинца также наблюдалась статистически значимо высокая частота парных нарушений (рисунок 5).

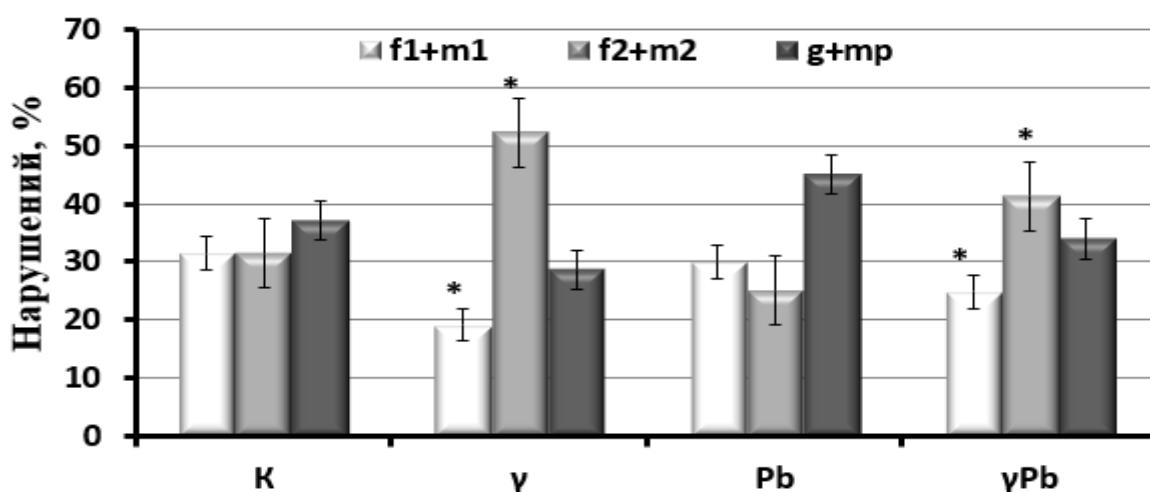


Рис.5. Спектр цитогенетических нарушений. Примечание: * – отличие от контроля (K) является статистически значимым при: $p < 0.05$.



Таким образом результаты исследования показали, что Гамма-облучение оказывает негативное влияние на всхожесть и дружность прорастания семян, снижая их жизнеспособность. В то же время, нитрат свинца в концентрации 2% демонстрирует противоположный эффект, стимулируя рост и развитие семян. Этот эффект, по-видимому, связан с тем, что анионы (NO₃)-считаются основным источником азота для большинства видов растений и способствуют высвобождению семян из состояния покоя и последующему их прорастанию нивелируя негативное влияние относительно небольшой концентрации свинца.

Анализ воздействия гамма-излучения и нитрата свинца как по отдельности, так и совместно, выявил их способность индуцировать цитогенетические аномалии. Однако, при совместном применении данных факторов наблюдается эффект антагонизма, который нивелирует кумулятивное увеличение частоты цитогенетических нарушений, характерное для раздельного воздействия каждого из них.

Список литературы:

1. Гераськин С.А., Дикорев В.Г., Удалова А.А., Дикарева Н.С. Влияние комбинированного действия ионизирующего излучения и солей тяжелых металлов на частоту хромосомных aberrаций в листовой меристеме ярового ячменя. //Генетика 1996 т.32.№2. С.279-288.
2. Гераськин С.А., Фесенко С.В., Черняева Л.Г., Санжарова Н.И. Статистические методы анализа эмпирических распределений коэффициентов накопления радионуклидов растениями // Сельскохозяйственная биология. 1994. № 1. С. 13–37.
3. Strona I.G. Obshcheyesemenovedeniye polevykh kul'tur [General seed production of field crops]. М.: Kolos, 1966. 464 p
4. Евсеева Т. И., Гераськин С. А., Вахрушева О. М. Оценка вклада факторов радиационной и химической природы в формирование биологических эффектов в популяции горошка мышиного с территории складирования отходов радиевого производства (пос. Водный, Республика Коми) // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 1. С. 85-96.
5. Гераськин С.А., Дикарева Н.С., Удалова А.А., Васильев Д.В., Волкова П.Ю. Последствия хронического облучения сосны обыкновенной в отдаленный период после аварии на Чернобыльской АЭС // Экология. 2016. №1. С. 30-43.

