

УДК 576. 312. 35/37

Е.Н. Муратова, М.Г. Корнилова, А.В. Пименов,
Т.С. Седельникова, О.С. Владимирова

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ ГОРНО-ХИМИЧЕСКОГО КОМБИНАТА НА КЛЕТКИ ЭЛОДЕИ КАНАДСКОЙ (*ELODEA CANADENSIS MICHX*)*

Производилось цитогенетическое изучение *Elodea canadensis Michx.* в акватории р. Енисей, подвергающейся радиоактивному загрязнению Горно-химическим комбинатом. Определены числа хромосом элодеи канадской. Установлена широкая изменчивость чисел хромосом от 24 до 96, встречаются анеуплоидия, миксоплоидия и полиплоидия. Отмечены хромосомные нарушения: агглютинация и фрагментация хромосом, отстающие, кольцевые хромосомы, неравномерное расхождение хромосом в анафазе. Интерфазные ядра данного вида содержат 1-4 ядрышка. Увеличено ядерно-ядрышковое отношение в опытных вариантах, что свидетельствует об ослаблении биосинтетических процессов в клетках.

Экспедиции на р. Енисей с участием ученых Красноярского научного центра РАН и специалистов других организаций выявили большие участки береговой зоны и островов, которые загрязнены техногенными радионуклидами (Носов и др., 1993; Кузнецов и др., 1994; Болсуновский и др., 1999, 2000; Сухоруков и др., 2000). Согласно результатам этих исследований, радиоактивное загрязнение донных отложений и поймы р. Енисей обусловлено деятельностью Горно-химического комбината г. Железногорска.

В качестве тест-объекта радиационного загрязнения р. Енисей изучалась элодея канадская (*Elodea canadensis Michx.*, семейство *Hydrocharitaceae*, Водокрасовые) (рис. 1). Данный вид широко используется для целей биомониторинга водных экосистем. Это многолетнее травянистое, почти космополитное растение, произрастающее в стоячих и медленно текущих водах; размножается преимущественно

* Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционного проекта СО РАН № 30.

вегетативно. Для Сибири элодея канадская - заносное растение, родиной которого является Северная Америка (Флора Сибири, 1988).



Рис. 1. *Elodea canadensis* Michx

В роде элодея кариологически изучено 6 видов, в том числе элодея канадская (Хромосомные числа..., 1969). По литературным данным, у *Elodea canadensis*, включая *E. canadensis* var. *gigantea* (= *E. gigantea*), известно два числа хромосом - $2n=24$ (John, 1965; Цвѣ, Цвѣ, 1974) и $2n=48$ (Rohweder, 1937; Harada, 1956; Хромосомные числа..., 1969; Цвѣ, 1980; Дмитриева, Парфенов, 1991). В России род элодея кариологически ранее не изучался. На территории стран бывшего СССР элодея канадская была изучена С.А. Дмитриевой и В.И. Парфеновым (Дмитриева, Парфенов, 1991) в Белоруссии (два местопроизрастания на территории Бerezинского биосферного заповедника). Число хромосом, установленное этими авторами, - $2n=48$.

Материалом для исследований послужили образцы, собранные в 2003-2004 гг. в правобережных протоках р. Енисей вниз по течению от г. Красноярска до устья р. Ангара - акватории, испытывающей максимальное влияние широкого спектра загрязняющих и радиоактивных веществ (Болсуновский и др., 1999). Участки отбора образцов: с. Есаулово (45 км от Красноярска, контроль), остров Атамановский (окр. пос. Атаманово, 86 км от Красноярска), с. Б. Балчуг (97 км от Красноярска), остров Журавлев (окр. с. Захаровка, 278 км), пос. Стрелка (330 км).

Исследования проводились на корешках взрослых растений, в зоне активного роста и деления клеток. Материал был обработан колхицином и зафиксирован в полевых условиях. Для разброса хромосом применяли обработку 0,1%-м колхицином в течение 4-5 ч. Часть материала была зафиксирована без обработки колхицином. В качестве фиксатора использовали уксуснокислый спирт (1 : 3). Перед окрашиванием материал протравливали 4% железоммонийными квасцами в течение 15-20 мин и окрашивали ацетогематоксилином. Проростки выдерживали в красителе 12-24 ч. После этого отрезали 1,5-2,0 мм от кончика корешка и помещали на предметное стекло в каплю насыщенного раствора хлоралгидрата; накрывали покровным стеклом и делали давлѣный препарат. Препараты просматривали под микроскопом МБИ-6 и фотографировали в масляной иммерсионной системе (объектив $\times 90$).

У элодеи канадской в акватории р. Енисей встречается несколько хромосомных чисел - $2n=24, 32, 40, 48, 56, 64, 72$ и 96 . В протоке около с. Есаулово и в районе пос. Стрелка элодея имеет весь вышеприведенный спектр чисел хромосом от 24 до 96; при этом в окрестностях с. Есаулово наиболее часто встречаются 32 и 48, а в пос. Стрелка - 40 и 48. В окрестностях с. Б. Балчуг растения характеризуются числами хромосом в диапазоне от 24 до 64 (24, 32, 40, 48, 64); наиболее часто встречаются 24, 32, 40. В районе с. Захаровка у растений обнаружены числа хромосом 24, 32, 40, 56; наиболее часто встречается 32. В районе с. Атаманово наблюдаются числа хромосом от 24 до 48 (24, 32, 40, 48); наиболее часто встречаются 32 и 40. Во всех пунктах сбора материала отмечались также анеуплоидные числа хромосом (от 20 до 96). Кроме того, имела место миксоплоидия, когда в пределах одного препарата (с одного корешка) наблюдались разные числа хромосом - анеуплоидные или чаще кратные основному набору. Метафазные пластинки с разным числом хромосом элодеи канадской представлены на рис. 2.

Хромосомы данного вида мелкие, 1-2 мкм и менее, что не позволяет с достоверностью произвести их измерение. Хромосомы по морфологии двуплечие, мета- или субметацентрики. Данные по числам хромосом, полученные при изучении элодеи канадской в акватории р. Енисей, позволяют прийти к заключению, что основным числом, по-видимому, является $x=8$.

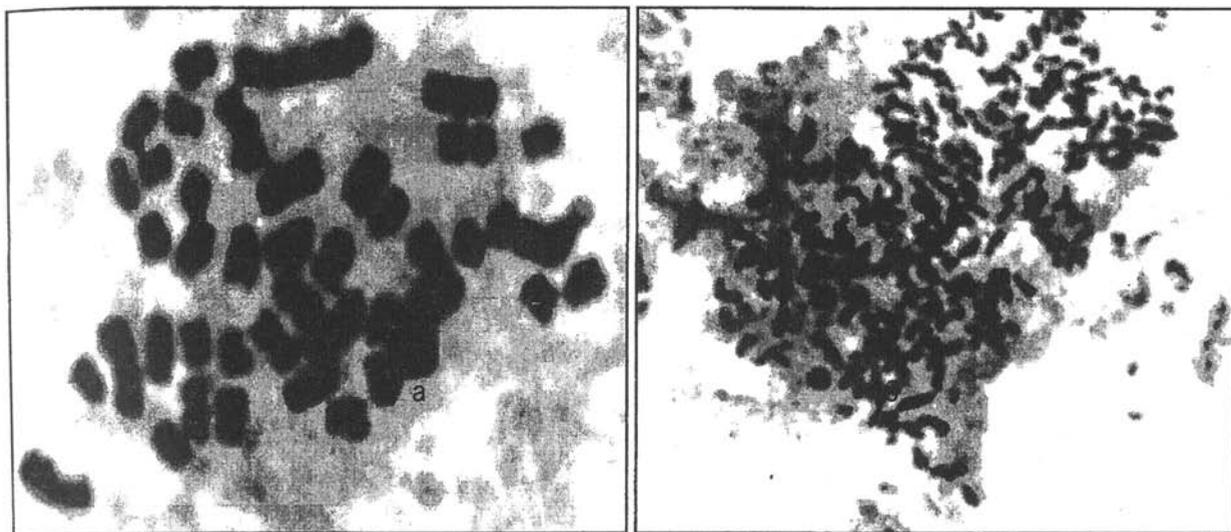


Рис. 2. Кариотип элодеи канадской: а - $2n=40$; б - $2n=96$. Об. 90 х, ок. 10 х

Результаты исследований показали, что в протоках бассейна р. Енисей встречаются различные хромосомные расы элодеи канадской, миксоплоидия и анеуплоидия. Вполне возможно, что изменчивость чисел хромосом у элодеи канадской в исследуемом районе объясняется радиоактивным загрязнением и загрязнением тяжелыми металлами (Болсуновский и др., 1999), так как в этом регионе находится Горно-химический комбинат Минатома РФ. С другой стороны, вариабельность хромосомных чисел встречается и у других гидро- и гидрофитов (Пробатова, Соколовская, 1981, 1984). Многие из этих видов хорошо размножаются вегетативно, а для элодеи канадской этот способ размножения является основным. При многократном вегетативном размножении могут накапливаться мутации, которые приводят к изменению чисел хромосом. Наличие хромосомной изменчивости расширяет норму реакции интродуцентов и способствует устойчивости вида при изменении условий среды.

Исследования показали, что в контроле (с. Есаулово) суммарная частота хромосомных нарушений в ана-телофазах составляет 10,3%. В то же время в опытных образцах нарушения составляют довольно высокий процент: пос. Стрелка - 34,8, с. Захаровка - 47,1, пос. Атаманово - 32,7 и с. Б. Балчуг - 25,0 (табл. 1). В районе с. Захаровка повышена частота встречаемости нарушений в метафазе. По характеру нарушений в изученных районах отмечены: агглютинация и фрагментация хромосом, кольцевые хромосомы, неравномерное расхождение хромосом в анафазе, отстающие хромосомы, множественные нарушения расхождения хромосом. Аномальное расхождение хромосом в митозе может быть связано с нарушениями функции сократительных белков веретена деления. Агглютинация возникает в результате слипания хроматина в метафазе или анафазе. Появление кольцевых структур свидетельствует о делециях плеч хромосомы с образованием участка с двумя "липкими" концами; этот участок замыкается в кольцо, и образуются два фрагмента (Дубинин, 1986).

Подобные типы нарушений хромосом отмечены у сосны обыкновенной, дуба черешчатого и березы повислой в 30-км зоне Чернобыльской АЭС и вблизи химического завода в г. Воронеже (Буторина, Исаков, 1989; Вострикова, 1999). В изученных образцах элодеи канадской также были установлены многочисленные случаи вакуолизации цитоплазмы, найдены микроядра. Микроядра образуются из целых хромосом в результате нарушения нормальной сегрегации в митозе. Они могут образоваться также из ацентрических фрагментов в результате aberrаций хромосом (Дубинин, 1986). Отмечен еще один тип аномалий в районе пос. Стрелка - остаточное ядрышко в ранней метафазе, когда в норме оно должно исчезнуть в профазе митоза. Это значит, что еще идет транскрипция рибосомных генов и синтез рРНК.

Частота встречаемости и спектр нарушений в ана-, телофазах у элодеи канадской (*Elodea canadensis Michx.*) в акватории р. Енисей

Происхождение	Число изученных ана- и телофаз, шт.	Частота встречаемости нарушений, шт/%	Спектр нарушений, шт/%				
			Неравномерное расхождение	Выбросы за пределы клетки	Отстающие хромосомы	Мосты	Агглютинация
Есаулово	1879	193/10,3	120/6,4	40/2,1	22/1,2	10/0,5	1/0,1
Стрелка	664	231/34,8	121/18,2	35/5,3	52/7,8	13/2	10/1,5
Захаровка	87	41/47,1	16/18,4	2/2,3	11/12,6	9/10,3	3/3,4
Атаманово	683	223/32,7	108/15,8	33/4,8	70/10,2	12/1,8	-
Б. Балчуг	677	169/25,0	133/19,6	21/3,1	12/1,8	2/0,3	1/0,2

Для элодеи канадской рассматривались количественные характеристики ядрышек такие, как их число и размеры, которые относятся к высокочувствительным способам определения влияния антропогенных факторов на клетку (Архипчук, 1990; Архипчук и др. 1992; Derenzini, Ploton, 1991). Определяли также показатели, которые характеризуют ядрышковую активность: число клеток с разным числом ядрышек, среднее число ядрышек на клетку, размеры (диаметр, площадь поверхности, объем) одиночных и парных ядрышек, определение содержания гомо- и гетероморфных ядрышек, суммарный размер всех ядрышек в клетке, ядерно-ядрышковое отношение.

Как правило, в каждом ядре содержатся 1-2 ядрышка, очень редко 3 или 4 (рис. 3). В результате исследований выяснилось, что число ядрышек является довольно консервативным показателем. Во всех вариантах среднее число ядрышек на клетку колеблется в узких пределах; несколько ниже это значение в пос. Стрелка. Кроме того, приблизительно равный процент клеток для разных происхождений содержит по одному и по два ядрышка (табл. 2).

Критерием гетероморфности ядрышек служил их диаметр, размеры которого отличались между ними в 1,5 раза. Наибольшее количество гетероморфных ядрышек в изученных ядрах оказалось в с. Захаровка (15,8%), наименьшее - в с. Есаулово (6,6%), (табл. 3). Средняя площадь ядрышек варьировала от 72,4 мкм² (пос. Стрелка) до 268 мкм² (с. Есаулово). Очевидно, что размер ядер варьирует в зависимости от физиологического состояния клеток, так как отражает интенсивность синтеза белка и уровень метаболизма клетки в целом.

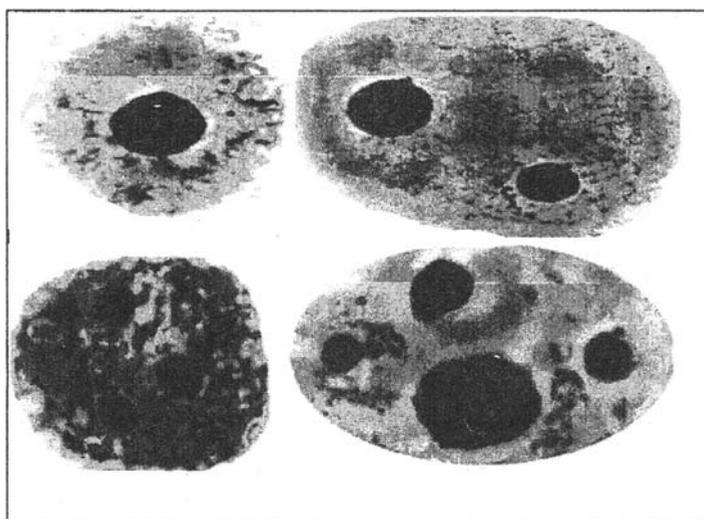


Рис. 3. Ядрышки в интерфазных ядрах элодеи канадской (*Elodea canadensis Michx*)

**Число ядрышек в интерфазных ядрах элодеи канадской
(*Elodea canadensis* Michx.) в акватории р. Енисей**

Происхождение	Число изученных ядер	Число ядрышек в ядре и частота его встречаемости (в шт. и %)				Среднее число ядрышек на ядро	C _v
		1	2	3	4		
с. Есаулово	500	388/77,6	104/20,8	7/1,4	1/0,20	1,24±0,02	38,1
пос. Стрелка	800	692/86,5	101/12,6	4/0,5	3/0,4	1,15±0,01	35,6
с. Захаровка	1022	803/78,6	195/19,1	24/2,3	-	1,24±0,01	38,6
пос. Атаманово	535	452/84,5	74/13,8	7/1,3	2/0,4	1,18±0,02	37,4
с. Б. Балчуг	622	525/84,4	85/13,7	10/1,6	2/0,3	1,18±0,02	37,8

Таблица 3

Морфологические характеристики ядрышкового материала элодеи канадской (*Elodea canadensis* Michx.) в акватории р. Енисей

Происхождение	Количество ядрышек в изученных ядрах *	Из них с одним ядрышком	Из них с двумя ядрышками		Средняя площадь ядрышка, мкм ²	Средний объем ядрышка, мкм ³
			Гомоморфные	Гетероморфные		
			шт/%	шт/%		
с. Есаулово	137	120/87,6	8/5,8	9/6,6	268,0±12,14	456,3±29,29
пос. Стрелка	166	87/72,5	13/10,8	11/9,2	72,4±3,91	67,7±5,68
с. Захаровка	161	85/70,8	10/8,3	19/15,8	91,4±4,18	92,4±6,23
пос. Атаманово	142	99/82,5	11/9,2	9/7,5	175,8±8,45	245,2±17,70
с. Б. Балчуг	142	101/84,2	4/3,3	12/10,0	142,6±8,00	184,9±16,13

* Число изученных ядер - 120.

Показатели ядерно-ядрышкового отношения выглядят следующим образом: с. Есаулово 6,0; пос. Стрелка - 6,9; с. Захаровка - 9,6; в пос. Атаманово - 7,7; с. Б. Балчуг - 7,3. Ядерно-ядрышковое отношение является хорошим показателем активности белок-синтезирующей системы (Алов и др., 1969; Шахбазов, Шестопалова, 1971). Любое изменение этого показателя свидетельствует о различиях в уровне биосинтеза белка. В частности, уменьшение значения ядерно-ядрышкового отношения индицирует возрастание объема ядрышка в ядре и усиление биосинтетических процессов в клетках у элодеи в контроле (с. Есаулово). Увеличение отношения свидетельствует об уменьшении объема ядрышка и соответственно об ингибировании и ослаблении этих процессов в клетках растений в загрязненных пунктах, особенно в окрестностях с. Захаровка.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что загрязнение поймы реки Енисей радионуклидами в результате радиохимического производства ГХК и эксплуатации атомных реакторов оказывают влияние на уровень клеточного метаболизма *Elodea canadensis*.

Литература

1. Алов, И.А. Основы Функциональной морфологии клетки / И.А. Алов, А.И. Брауде, М.Е. Аспиз. - М.: Медицина, 1969. - 344 с.
2. Архипчук, В.В. Влияние малых доз радиации на ядрышковую активность эмбрионов карповых рыб / В.В. Архипчук // Радиобиология. - 1990. - Т. 30. - № 4. - С. 496-501.
3. Цитогенетический анализ определения влияния пороговых величин антропогенных факторов на геном растений и животных / В.В. Архипчук, В.Д. Романенко, М.В. Архипчук, Л.С. Кипнис // Докл. РАН. - 1992. - Т. 326. - № 5. - С. 908-910.

4. Радиоактивное загрязнение территории населенных пунктов Красноярского края в регионе размещения горно-химического комбината / А.Я. Болсуновский, В.П. Атурова, М. Бургер, Э. Шмид // Радиохимия. - 1999. - Т. 41. - № 6. - С. 563-568.
5. Исследование высокоактивных проб почвы и горячих частиц поймы реки Енисей / А.Я. Болсуновский, В.О. Черкезян, К.В. Барсукова, Б.Ф. Мясоедов // Радиохимия. - 2000. - Т. 42. - Вып. 6. - С. 560-564.
6. Буторина, А.К. Пуфинг хромосом в метафазе-телофазе митотического цикла у дуба черешчатого / А.К. Буторина, Ю.Н. Исаков // ДАН СССР. - 1989 - Т. 308. - № 4. - С. 987-989.
7. Вострикова, Т.В. Цитология митоза у березы повислой (*Betula pendula* Roth.) / Т.В. Вострикова // Цитология. - 1999. - Т. 41. - № 12. - С. 1058-1059.
8. Дмитриева, С.А. Кариология флоры как основа цитогенетического мониторинга (на примере Березинского биосферного заповедника) / С.А. Дмитриева, В.И. Парфенов. - Минск: Наука и техника, 1991. - 230 с.
9. Дубинин, Н.П. Общая генетика. 3-е изд. / Н.П. Дубинин. - М.: Наука, 1986. - 559 с.
10. Кузнецов, Ю.В. К оценке вклада реки Енисей в общую радиоактивную загрязненность Карского моря / Ю.В. Кузнецов, Ю.А. Ревенко, В.К. Легин // Радиохимия. - 1994. - Т. 36. - Вып. 6. - С. 546-559.
11. Радиоактивное загрязнение р. Енисей, обусловленное сбросами Красноярского горно-химического комбината / А.В. Носов, М.В. Ашанин, А.Б. Иванов, А.М. Мартынова // Атомная энергия. - 1993. - Т. 74. - Вып. 2. - С. 144-150.
12. Пробатова, Н.С. Хромосомные числа некоторых видов водной и прибрежной флоры Приамурья в связи с особенностями ее формирования / Н.С. Пробатова, А.П. Соколовская // Ботан. журн. - 1981. - Т. 66. - № 11. - С. 1584-1594.
13. Пробатова, Н.С. Числа хромосом представителей семейств *Hydrocharitaceae*, *Hypericaceae*, *Juncaginaceae*, *Poaceae*, *Potamogetonaceae*, *Ruppiaceae*, *Sparganiaceae*, *Zannicheliaceae*, *Zosteraceae* с Дальнего Востока СССР / Н.С. Пробатова, А.П. Соколовская // Ботан. журн. - 1984. - Т. 69. - № 12. - С. 1700-1702.
14. Сухоруков, Ф.В. Основные черты распределения техногенных радионуклидов в аллювиальных почвах и донных осадках р. Енисей / Ф.В. Сухоруков, М.С. Мельгунов, С.И. Ковалев // Сиб. экол. журн. - 2000. - № 1. - С. 39-50.
15. Флора Сибири. Т. 1. *Lycopodiaceae* - *Hydrocharitaceae*. - Новосибирск: Наука, 1988. - 200 с.
16. Хромосомные числа цветковых растений / З.В. Волховских, В.Г. Гриф, О.И. Захарьева, Т.С. Матвеева; под ред. А.А. Федорова. - Л.: Наука, 1969. - 928 с.
17. Шахбазов, В.Г. Некоторые особенности ядрышка в клетках гибридного лука / В.Г. Шахбазов, Н.Г. Шестопалова // Докл. АН СССР. - 1971. - Т. 196. - № 5. - С. 1207-1208.
18. Derenzini, M. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells / M. Derenzini, D. Ploton // Int. Rev. Exp. Pathol. - 1991. - Vol. 32. - P. 149-191.
19. Harada, I. Cytological studies in *Helobiae*. I. Chromosome idiograms and a list of chromosome numbers in seven families // Harada // Cytologia. - 1956. - Vol. 21. - № 3. - P. 306-328.
20. John, H.S. Monograph of the genus *Elodea*. Summary / H.S. John // Rhodora. - 1965. - Vol. 67. - № 770. - P. 155-181.
21. Ljve, A. ЮРВ chromosome number reports. LXIX / A. Ljve. - Taxon, 1980. - Vol. 29. - P. 276-277.
22. Ljve, A. Cytotaxonomical atlas of the Slovenian flora / A. Ljve, D. Ljve. - Lehre, 1974. - P. 1241.
23. Rohweder, H. Versus zur Erfassung der mengenmassigen bedeckung des Darss und Zingst mit polyploiden Pflanzen. Ein Beitrag zur Bedeutung der Polyploidie bei der Eroberung neuer Lebensraume / H. Rohweder // Planta. - 1937. - Vol. 27. - № 4. - P. 501-549.