

Л.П. Хлебова¹, Н.Н. Чернышева², О.В. Бычкова¹, А.П. Крайнов¹
**ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ РЕКИ ЧУМЫШ
В КЛЕТКАХ КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ *ALLIUM CEPA* L.**

¹Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

²Алтайский государственный аграрный университет, Барнаул, Россия

E-mail: hlebova61@mail.ru; nnchernisheva@mail.ru; olga4ka_asu@mail.ru; tema_rid@mail.ru

Изучены цитогенетические эффекты донных отложений (ДО) реки Чумыш в окрестностях населенного пункта Тальменка (Россия, Алтайский край). Установлено, что водные вытяжки донных отложений оказывают негативное цитотоксическое действие на тест-систему *Allium cepa* L., снижая в 1,7 раза митотическую активность клеток корневой меристемы. Уровень патологических митозов (14,01%), существенно превышающий фоновое значение (0,86%), указывает на присутствие в донных отложениях водоема факторов, обладающих суммарной мутагенной активностью (СМА). Согласно показателю «выраженность мутагенной активности», уровень СМА опытных проб классифицируется как «высокий». Основными нарушениями являются различные виды неравномерного расхождения хромосом. Доминирование в спектре аномалий патологий веретена деления дает основание полагать о химическом загрязнении донных отложений р. Чумыш. Стрессовые факторы, присутствующие в ДО, активизируют адаптационные механизмы клеток тест-объекта, направленные на сохранение их жизнеспособности и надёжности передачи генетической информации следующим клеточным поколениям. К числу таких адаптационных механизмов относятся формирование микроядер и полиплоидизация клеток.

Ключевые слова: донные отложения, генотоксический эффект, *Allium*-тест, корневая меристема, митотический индекс, аномалии митоза, механизмы адаптации, река Чумыш.

L.P. Khlebova¹, N.N. Chernysheva², O.V. Bychkova¹, A.P. Kraynov¹
**GENOTOXIC EFFECTS OF BOTTOM SEDIMENTS FROM CHUMYSH RIVER
IN *ALLIUM CEPA* L. ROOT MERISTEM CELLS**

¹Altai State University, Barnaul, Russia

²Altai State Agricultural University, Barnaul, Russia

E-mail: hlebova61@mail.ru; nnchernisheva@mail.ru; olga4ka_asu@mail.ru; tema_rid@mail.ru

Cytogenetic effects of bottom sediments from Chumysh river near Talmenka (Russia, Altai Territory) were studied. It was found that the aqueous extracts of bottom sediments induced a strong cytotoxic effect reducing 1.7 times the mitotic activity in the apical root meristem in *Allium cepa* test system. The level of pathological mitoses (14.01%) was significantly higher than the background value (0.86%) and indicated the presence of factors with a total mutagenic activity in the bottom sediments of the river. This level is classified as high one. The different types of unequal chromosome segregation were the main violations during cell divisions. Dominance in the spectrum of anomalies metaphase spindle pathologies gave reason to believe about the chemical contamination of bottom sediments from Chumysh river. Stress factors of the sediments activate adaptive mechanisms of cells in test system to preserve their viability and reliability of the transmission of genetic information to future cell generations. The adaptive mechanisms are micronucleus and polyploidy cell formations.

Keywords: bottom sediments, genotoxic effect, *Allium* test, apical root meristem, mitotic index, abnormalities of mitosis, adaptation mechanisms, Chumysh river.

Citation:

Khlebova, L.P., Chernysheva, N.N., Bychkova, O.V., Kraynov, A.P. (2016). Genotoxic effects of bottom sediments from Chumysh River in *Allium cepa* L. root meristem cells.

Biological Bulletin of Bogdan Chmelniitskiy Melitopol State Pedagogical University, 6 (3), 347–358.

Поступило в редакцию / Submitted: 13.11.2016

Принято к публикации / Accepted: 12.12.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/2016104>

© Хлебова, Чернышева, Бычкова, Крайнов, 2016

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0. License

ВВЕДЕНИЕ

Антропогенное воздействие на гидросферу приводит к повсеместному росту токсического загрязнения водных систем. Проблема сохранения чистоты внутренних водоёмов – одна из основных среди современных глобальных экологических вызовов (Фомичева и др., 2004; Томила и др., 2008; Медведева, Болсуновский, 2016). Следствием накопления в водоёмах разнообразных химических веществ является миграция и трансформация токсикантов, их перенос по трофическим цепям, синергическое и антагонистическое действие в многокомпонентных системах. Химические элементы, сами по себе не мутагенные, при взаимодействии в водной среде могут образовывать соединения, оказывающие генотоксическое воздействие (Марченко, 2007).

Водные объекты Алтайского края не являются исключением в общей тенденции ухудшающегося экологического состояния и испытывают значительную антропогенную нагрузку. Большая часть водоемов нашего региона относится по классу качества воды к категориям «очень загрязненных» и «грязных». Согласно ежегодно публикуемым официальным докладам о состоянии окружающей среды, наиболее характерными веществами, загрязняющими поверхностные воды края, являются нефтепродукты, фенолы летучие, соединения азота, фосфаты, железо общее (Государственный доклад «О состоянии...», 2016). Большая часть этих веществ относится к группе ксенобиотиков и может оказывать токсическое, канцерогенное, тератогенное или аллергенное влияние на живые системы.

Большая роль в функционировании водной экосистемы отводится донным отложениям, которые с одной стороны являются средой обитания бентосных организмов и источником пищи для многих гидробионтов, а с другой стороны – местом депонирования загрязняющих веществ. При этом степень накопления токсикантов, особенно органических, может быть столь высока, что они способны полностью подавить процесс самоочищения в придонном слое воды (Степанова и др., 2012). В связи с этим, исследование потенциального воздействия на биологические объекты веществ, аккумулированных в донных отложениях, является актуальным (Дубинина, 1996; Томила и др., 2008; Крамер, 2015).

Растительные тест-системы в настоящее время широко используются в качестве индикаторов генотоксичности различных факторов окружающей среды (Вострикова, Буторина, 2006; Ереценко, Хлебова, 2012; 2013; Калаев, Попова, 2014; Хлебова, Ереценко, 2012; 2014; Хлебова, Бычкова, 2016). Биотестирование с применением лука репчатого (*Allium cepa* L.) показало его высокую эффективность для оценки токсической и мутагенной активности большого ряда соединений (Евсеева и др., 2005; Seth *et al.*, 2008; Leme & Marin-Morales, 2009; Yildiz *et al.*, 2009; Trushin *et al.*, 2013; Буданцев, 2014; Firbas & Amon, 2014; Silveira *et al.*, 2016). Данный объект позволяет регистрировать различные типы хромосомных мутаций, индуцируемых как прямыми мутагенами, непосредственно повреждающих ДНК, так и промутагенами, приобретающими генетическую активность в организме в процессе метаболизма (Fiskesio, 1985; Прохорова и др., 2013). Показатели *Allium*-теста хорошо коррелируют с результатами, полученными на других объектах, в том числе клетках млекопитающих (Ghosh *et al.*, 2011). Данную систему широко используют и для оценки биологических эффектов загрязнения водных сред (Espinoza-Quiñones *et al.*, 2009; Radić *et al.*, 2010; Barberrio *et al.*, 2011; Geras'kin *et al.*, 2011; Salles *et al.*, 2016; Чернышева и др., 2016).

Цель данной работы – оценка суммарной мутагенной активности донных отложений реки Чумыш (Россия, Алтайский край) с использованием в качестве тест-системы лука репчатого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили пробы донных отложений р. Чумыш, собранные в периоды максимального половодья (конец апреля) и пониженного потенциала самоочищения водоема (первая декада октября) (Галахов, 2003). Река Чумыш – один из наиболее крупных притоков Верхней Оби, протекает в основном по Бийско-Чумышской возвышенности и в своем среднем и нижнем течении пересекает ряд населенных пунктов Алтайского края, в том числе г. Заринск и р.п. Тальменка. Исследованы участки, расположенные в окрестностях населенного пункта р.п. Тальменка (Россия, Алтайский край). Отобрано 8 образцов (по 4 в каждый период исследования): ДО-1 – правый берег, 1 км выше поселка; ДО-2 – левый берег, 1 км выше поселка; ДО-3 – правый берег, 1 км ниже поселка; ДО-4 – левый берег, 1 км ниже поселка. Пробы отбирали вблизи берега из верхнего слоя толщиной до 20 см, протирали через полиэтиленовую сеть с размером ячеек 0,9 см и хранили при 4–5°C (Щербань и др., 1994).

О токсичности донных отложений судили на основании биотестирования их водных вытяжек. Для приготовления водной вытяжки каждую пробу смешивали с водопроводной водой в объемном соотношении 1:4, встряхивали в течение 2 часов, затем отстаивали в течение 1 часа. Полученную надосадочную жидкость сливали и центрифугировали 10 мин при скорости 4000 об/мин. Потенциальный биологический эффект водных вытяжек оценивали с использованием тест-объекта – лука репчатого. Перед началом тестирования удаляли внешние чешуи и нижнюю пластинку, не повреждая первичные корешки. С целью синхронизации клеточных делений стандартные луковичы замачивали в

водопроводной воде и выдерживали в течение суток в темноте при температуре +4°C, затем температуру повышали до +22°C. Когда корни достигали длины 2-3 мм, луковицы переносили в стаканы, содержащие приготовленные вытяжки ДО, и культивировали в течение нескольких дней при температуре +24-25°C. Контролем служила проба с отфильтрованной водопроводной водой средней жесткости. Кроме того, был заложен вариант, в котором луковицы проращивали в стаканах с дистиллированной водой (проба 5). Корни длиной 10-12 мм фиксировали по методу Карнуа в смеси 96% этанола и уксусной кислоты (3:1). Материал хранили в 70% этиловом спирте при температуре +4°C. Цитологический анализ митоза в клетках корневой меристемы проводили на микроскопе AXIO ZEISS Imager.Z1 при увеличении 10x15x90 на временных давленных препаратах после окрашивания ацетоарсенином (Barberrio. 2011). Учитывали общее количество клеток на препарате, количество делящихся клеток, количество и тип патологических митозов. Анализировали не менее 2000 шт. на образец.

Цитотоксичность донных отложений оценивали по показателю интенсивности пролиферации клеток корневой меристемы – митотическому индексу (МИ, %). Для оценки генотоксичности проб определяли долю патологических митозов среди общего числа делящихся клеток (ПМ, %), а также типы и частоту различных нарушений клеточного деления. Мутагенную активность донных отложений оценивали по суммарной мутагенной активности (СМА), уровень которой определяли показателем «выраженность мутагенной активности» (ВМА). ВМА рассчитывали как разность превышения (%) частоты видимых мутаций у *Allium cepa*, вызванных воздействием водных вытяжек (опытный вариант), над контрольным уровнем (табл. 1) (Прохорова, Фомичева, 2003).

Таблица. 1. Оценка уровня суммарной мутагенной активности при использовании метода учета хромосомных aberrаций (ХА) в мета- и ана-телофазе митоза у *Allium cepa* L.

Показатель	Отсутствие СМА	Уровни СМА		
		Слабая СМА	Средняя СМА	Сильная СМА
Превышение частоты ХА над контрольным уровнем (разность)	Отсутствие достоверных различий	Достоверные различия менее чем на 10%	Достоверные различия на 10-25%	Достоверные различия более чем на 25%

Достоверность различий полученных результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента при $p < 0,05$. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитогенетические методы рассматривают как наиболее чувствительные для эффективной оценки мутагенного и токсического эффектов неблагоприятных экологических факторов на окружающую среду. Анализ нарушений митотических циклов дает возможность выявлять ранние изменения цитогенетической системы организма в отсутствии фенотипических проявлений и на основании этого делать адекватные прогнозы дальнейшего состояния системы в меняющихся условиях среды. Известно, что целый ряд мутагенов оказывает синергетический и кумулятивный эффекты на клеточный аппарат, что позволяет оценивать их комплексное воздействие даже при незначительном уровне загрязнения.

Одна из основных характеристик митотического режима организма – митотическая активность клеток меристематических тканей, показателем которой является митотический индекс. На рисунке 1 представлена пролиферативная активность клеток апикальной меристемы тест-объекта. Водные вытяжки донных отложений р. Чумыш не зависимо от срока отбора проб оказывали угнетающее действие на клеточное деление при формировании корневой системы лука репчатого. Среднее значение МИ в опытных вариантах составило 5,67% (ДО-1 – ДО-4), что в 1,7 раза уступало контрольному показателю (9,66%, $p < 0,05$). Наиболее выраженный эффект наблюдали в пробах, отобранных в первую декаду октября, когда показатель митотической активности достигал лишь 50,52% относительно контрольного значения ($p < 0,01$). Донные отложения правобережного участка реки (ДО-1, ДО-3) вызывали достоверное снижение ($p < 0,05$) митотического индекса клеток биотестора в сравнении с ДО левого берега (ДО-2, ДО-4) на 21,3 и 23,3% в периоды максимального половодья (апрель) и осенней межени (октябрь), соответственно. Статистически значимые различия действия проб, собранных выше и ниже населенного пункта, не установлены.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии в донных отложениях водоема компонентов токсического действия, обуславливающего депрессивный характер митотической

активности апикальной меристемы корешков лука репчатого. Выполненное нами ранее исследование проб воды р. Чумыш выявило аналогичную неоднородность временного и пространственного распределения характеристик в пределах одного створа. Однако образцы, отобранные в апреле во время половодья, в отличие от проб осеннего периода, оказывали митозостимулирующее действие на пролиферирующие ткани, что характерно для слабых стрессовых воздействий поллютантов либо их синергетического эффекта (Чернышева и др., 2016). Подобной стимуляции клеточных делений в тканях тест-объекта, культивируемого на водных вытяжках ДО, не наблюдали, что свидетельствует о более высоких концентрациях негативных компонентов либо различиях их состава.

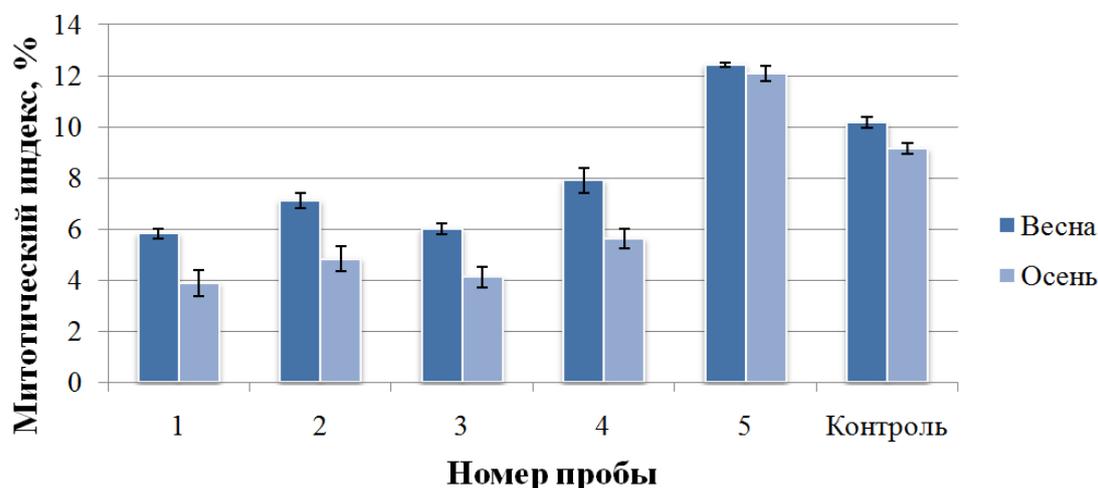


Рис. 1. Митотическая активность клеток корневой меристемы лука репчатого, индуцированная водными вытяжками донных отложений р. Чумыш

Таким образом, речная вода и донные отложения одного и того же водоема имеют различные экологические эффекты на тестируемые объекты. Вероятно, это связано с тем, что в воде присутствуют вещества, транзитно поступающие с выперасположенных участков реки, поэтому возможны кратковременные острые загрязнения, которые в дальнейшем могут нивелировать и не оказывать заметного отрицательного воздействия на экосистему водоема. В донных отложениях происходит накопление поллютантов и их трансформация в течение длительного периода, что приводит к более выраженному токсическому влиянию на биоту. Подтверждением данного тезиса может служить выше отмеченный факт существенно более сильного угнетающего воздействия водных вытяжек ДО, отобранных осенью, в период пониженного потенциала самоочищения водоема, на пролиферацию клеток.

Представляет интерес обсудить результаты проращивания тест-объекта, погруженного в дистиллированную воду (проба 5). Среднее значение МІ составило 12,25%, что существенно превысило контрольный показатель ($p < 0,05$). Митозостимулирующий эффект дистиллированной воды как среды для культивирования лука репчатого был сходен по силе воздействия с опытными пробами весеннего периода (Чернышева и др., 2016), что свидетельствует о ее токсическом воздействии на живой объект. Следовательно, использование дистиллированной воды в качестве контроля при биотестировании различных сред или веществ является нежелательным.

На рис. 2 представлены результаты цитогенетического исследования уровня патологических митозов в клетках апикальной меристемы корешков лука репчатого, позволяющего провести оценку суммарной мутагенной активности компонентов донных отложений р. Чумыш.

Фоновое значение различных нарушений клеточного деления составило 0,86%. Патологии, индуцированные опытными образцами ДО, в среднем в 16,3 раза превысили контрольный показатель. Наиболее часто аномальные клетки встречались в корнях лука, выросших на пробах, отобранных в октябре (15,34%). Довольно высокий уровень цитогенетических нарушений является показателем генотоксического воздействия донных отложений на растительный организм. Согласно показателю ВМА, уровень суммарной мутагенной активности водных вытяжек ДО р. Чумыш классифицируется как «высокий». В отличие от общего уровня митотической активности корневой меристемы тест-объекта пространственные различия частоты патологических митозов в зависимости от места отбора материала статистически незначимы.

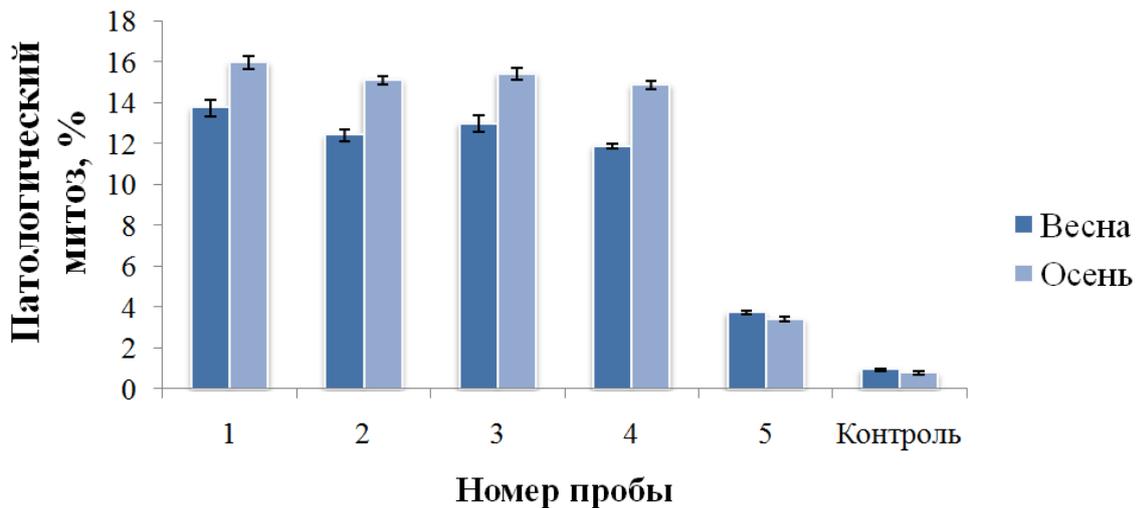


Рис. 2. Частота патологических митозов, индуцированных водными вытяжками донных отложений р. Чумыш, в апикальной меристеме корней лука репчатого, %

Повышенный уровень различных аномалий клеточного деления в корневой меристеме лука репчатого (3,58%), культивируемого на дистиллированной воде (проба 5), подтверждает вывод о нецелесообразности ее использования для оценки фоновых значений частоты спонтанных нарушений митотических циклов растительных тест-систем.

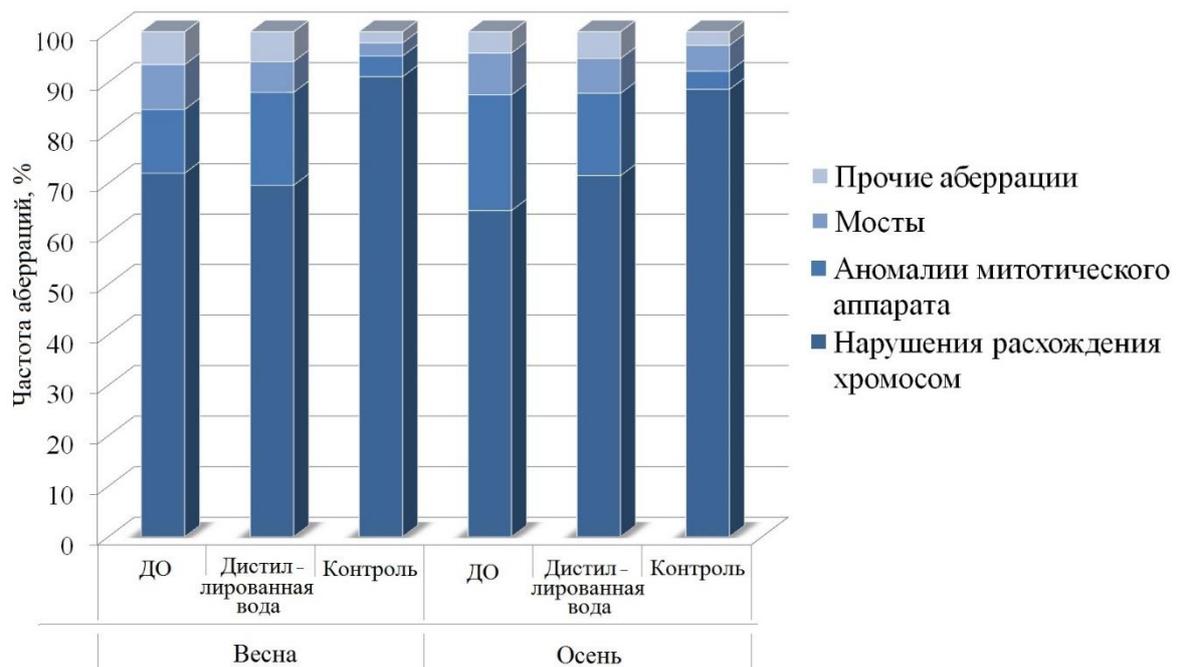


Рис. 3. Спектр нарушений митоза на стадиях мета- и ана-телофазы в апикальной меристеме корней лука репчатого, %

Сравнительный анализ частот основных типов нарушений митоза также не выявил достоверных различий между образцами, отобранными в различных районах створа реки в пределах одного сезона. В связи с этим результаты как осеннего, так и весеннего периода исследований проб объединены в группы в зависимости от разновидности патологии: нарушения расхождения хромосом (выбросы за пределы веретена деления, отставание, забегание и преждевременное расхождение хромосом), аномалии митотического аппарата (многополюсный, ассиметричный, моноцентрический митоз, полиплоидия), мосты (одиночные и множественные). Остальные аномалии, частота которых была мала, объединены в группу «прочие аберрации», куда вошли фрагментация, агглютинация, пульверизация хромосом (рис. 3).

Следует отметить, что спектр митотических нарушений в данном эксперименте, не отличался от аберраций, отмеченных ранее при исследовании проб воды р. Чумыш (Чернышева и др., 2016).

Среди выявленных нарушений, как в контрольных, так и опытных образцах доминировали различные виды неравномерного расхождения хромосом (64,6–88,6%) (рис. 4А, 4Б). Отставание хромосом в метакинезе и при расхождении к полюсам возникает, как правило, при повреждении кинетохора. Такие хромосомы «дрейфуют» в цитоплазме, не совершая движения к экваториальной пластинке, а на стадии телофазы оттесняются в одно из дочерних ядер либо в дальнейшем элиминируются.

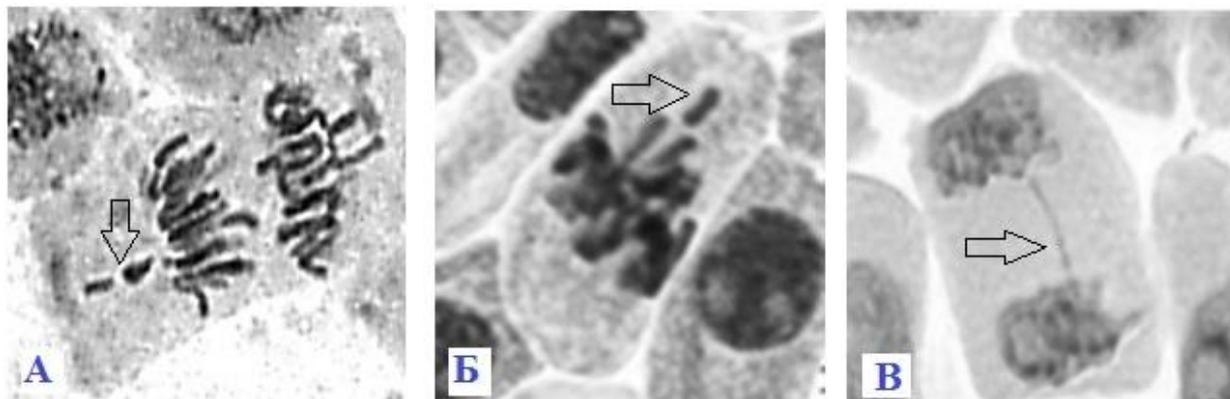


Рис. 4. Патологии митоза клеток корневой меристемы лука репчатого, индуцируемые водными вытяжками ДО р. Чумыш: А – забегание хромосом; Б – выброс хромосомы за пределы веретена деления; В – мост

Второй по численности оказалась группа патологий, включающая различные аномалии митотического аппарата (рис. 5), их частота варьировала от 3,6 (контроль) до 22,9% (ДО осеннего периода). Подобные нарушения клеточного деления, как правило, вызывают задержку митоза на стадии метафазы. Исследованные образцы индуцировали ассиметричные, моно- и многополюсные митозы. Такие аномалии чаще всего связаны с дезорганизацией центриолей и веретена деления, что свидетельствует о наличии в компонентном составе изученных водных вытяжек ДО митотических ядов, воздействующих на полимеризацию-деполимеризацию цитоплазматического глобулярного белка тубулина, входящего в состав микротрубочек. Результатом описанных патологий являются многоядерность, анеуплоидия и полиплоидия.

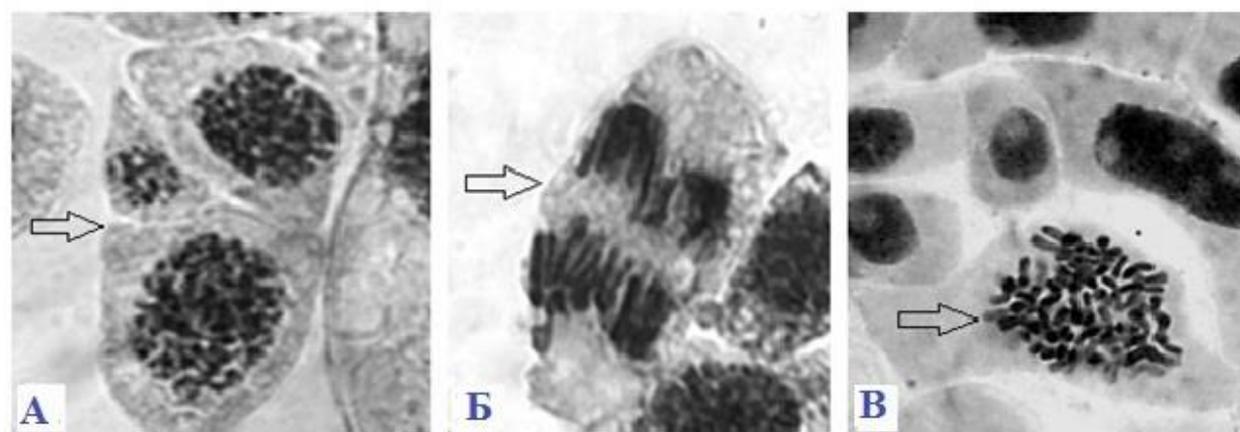


Рис. 5. Аномалии митотического аппарата в корневой меристеме лука репчатого: А – трехполюсный митоз; Б– четырехполюсный митоз; В – полиплоидная клетка

Хромосомные аберрации в виде анафазных мостов были выявлены в 2,6 – 8,9% делящихся клеток (рис. 4В). Кроме того, регистрировали клетки с центрическими и ацентрическими фрагментами, хромосомными и хроматидными кольцами. Фрагментация хромосом является признаком разрушения их структуры, связанного с лизированием ферментами молекул ДНК и служит показателем нестабильности генома. Известно, что фрагментация хромосом возникает в результате воздействия на нормальные клетки ионизирующего излучения или химических мутагенов. Большинство фрагментов лишены центромеры и кинетохора, участвующих в движении хромосом. Поэтому ацентрические фрагменты оставались

неподвижными и отставали во время метакинеза и при расхождении к полюсам. В редких случаях наблюдали пульверизацию всего хромосомного комплекса на фрагменты. При массовой фрагментации хромосом фрагменты беспорядочно рассеивались по цитоплазме и также не участвовали в общем движении хромосом. Наличие мостов свидетельствует о том, что исследованные пробы содержат вещества, способные вызывать слияние теломерных участков хромосом либо разрывы в ДНК, приводящие к нерасщепленным транслокациям. При асимметричном обмене в результате соединения фрагментов с центромерами образуется дицентрик (хромосома с двумя центромерами), что приводит при расхождении хромосом в анафазе к появлению мостов.

Следствием фрагментации или отставания отдельных хромосом, вокруг которых в телофазе формируется ядерная оболочка, является появление микроядер. Новообразованные микроядра либо сохраняются в течение всего клеточного цикла, либо подвергаются пикнозу, разрушаются и выводятся из клетки. Все исследованные пробы донных отложений р. Чумыш индуцировали микроядра. Данные структуры, выявляемые на стадии телофазы, представляли собой небольшие по размеру, хорошо оформленные округлые образования ядерного материала, расположенные в цитоплазме клетки на некотором удалении от основного ядра (рис. 6).

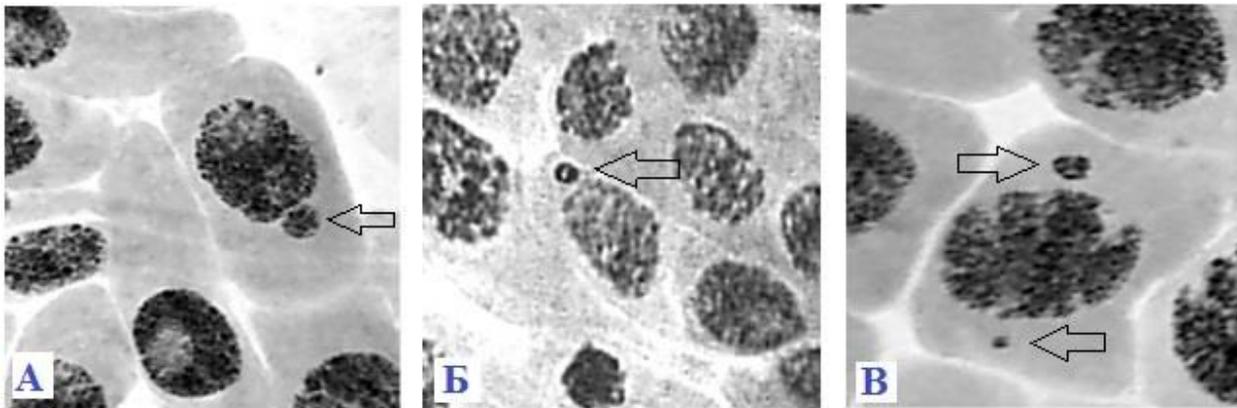


Рис. 6. Микроядра в клетках апикальной меристемы корней *A. cerfa*, индуцированные водными вытяжками ДО: А – одно крупное микроядро; Б – одно мелкое микроядро; В – два микроядра: крупное и мелкое

В меристематической ткани тест-объекта преобладали клетки с одним микроядром, реже с двумя либо тремя. По размерам микроядер можно судить об изменениях, произошедших в хромосомном наборе. Так, образование крупных микроядер связывают с геномными нарушениями, а мелких – с нарушениями в структуре хромосом (Ильинских и др., 1992). Сравнительный анализ разнообразия клеток с данным типом аномалий показал преимущественное появление крупных микроядер (рис. 6А, 6В), что, вероятно, обусловлено особенностями спектра патологических митозов. Как указывалось выше, различные нарушения митотического аппарата и расхождения хромосом доминировали среди остальных патологий (рис. 3).

Образование микроядер, по мнению ряда исследователей, является следствием проявления адаптационного механизма популяции клеток меристемы тестора в условиях воздействия агрессивных факторов внешней среды. Биологический смысл этого процесса заключается в изоляции повреждённых мутагенами хромосом либо их фрагментов, что предотвращает их дальнейшее участие в делении клетки и передаче генетической информации следующему поколению клеток. Поскольку при прохождении «точек контроля» клеточного цикла (checkpoints) микроядра, как правило, элиминируются, их обособление направлено на сохранение жизнеспособности клетки, и его можно рассматривать как самозащиту генетического аппарата от последующих аномальных делений, в ряде случаев приводящих к гибели этой клетки. В нашем эксперименте установлено, что пробы, индуцирующие высокую частоту митотических нарушений, вызвали образование максимального количества клеток с микроядрами. Так в материале, отобранном в осенний период, где доля патологий наиболее высока, обнаружено 5,4% клеток с микроядрами. Частота индукции подобных структур в корневой меристеме лука репчатого, культивируемого на пробах весеннего периода, была существенно ниже и составила 3,2%. Использование дистиллированной воды для проращивания тест-объекта также обусловило в процессе митотического деления обособление в дочерних клетках некоторого числа микроядер (0,41%), в то время как в контроле (водопроводная вода) они отсутствовали. Факт отсутствия микроядер в клетках контрольных образцов и интенсификация процесса на фоне возрастающей частоты патологий, связанных с дезориентацией и

нарушениями расхождения хромосом, на наш взгляд, подтверждает гипотезу запуска адаптационных механизмов на молекулярно-генетическом уровне.

Как отмечено выше, цитогенетическое тестирование донных отложений р. Чумыш выявило наличие среди пула различных типов патологических митозов некоторое число полиплоидных клеток, преимущественно при оценке образцов, отобранных в октябре (рис. 5В). В контроле в меристематической ткани лука репчатого явление полиплоидии не наблюдали. Известно, что плоидность генома также контролируется системой контрольных точек (checkpoints) (Hayashi, 1996). В ответ на изменение плоидности она блокирует дальнейшую прогрессию клеток в клеточном цикле. Так при изучении особенностей прохождения митоза у личинок *fff3* линии дрозофилы, мутантной по гену клеточного цикла, в отдельных клетках наблюдали увеличение плоидности ядра после монополярного расхождения хроматид в анафазе, в результате чего возникали тетраплоидные клетки. Однако в дальнейшем происходило блокирование деления тетраплоидных клеток и их полное отсутствие в метафазе (Лебедева и др., 2003).

Таким образом, в нашем эксперименте появление полиплоидных клеток в тканях тест-объекта при максимально выраженном мутационном давлении инкубационной среды (водные вытяжки ДО), вероятнее всего, связано с индукцией адаптационных механизмов на клеточном уровне. Можно предположить, что система контроля клеточного цикла заблокирует в дальнейшем деление таких клеток, препятствуя сохранению геномной мутации. Кроме того, исследования на дрозофиле показали, что гиперплоидные клетки ($2n + 1$), в отличие от тетраплоидных, преодолевали checkpoints, сохраняя способность к делению и в дальнейшем обнаруживались в метафазе (Лебедева и др., 2003). Известны и другие случаи преодоления мутантными анеуплоидными клетками «контрольно-пропускных пунктов» клеточного цикла. Это явление получило название «адаптации точек контроля» (Goebl & Byers, 1988). Возможно, активизация процессов формирования микроядер в меристеме лука репчатого под воздействием веществ, присутствующих в исследуемых вытяжках ДО, связана с возрастанием доли гиперплоидных клеток, которые, в свою очередь, возникают вследствие патологий нитей веретена деления и аномалий кинетохора хромосом. Беспрепятственное прохождение такими клетками третьей контрольной (M-сверочной) точки клеточного цикла запускает механизм изоляции «лишних» хромосом и их фрагментов в виде обособленных микроядер.

Таким образом, депрессия митотической активности, индукция большого числа патологических митозов и широкий спектр aberrаций в делящихся клетках тест-объекта свидетельствует о многокомпонентном составе водных вытяжек донных отложений р. Чумыш токсического и мутагенного действия.

Существует мнение, что характер аномалий клеточных делений может отражать природу фактора, присутствующего в окружающей среде. Так воздействие радиации приводит к возрастанию частоты хромосомных aberrаций в клетке (делеции, транслокации), а действие химических мутагенов чаще всего вызывает генные мутации или повреждения митотического веретена (Geras'kin *et al.*, 2011; Медведева, Болсуновский, 2016). Преобладание в нашем исследовании патологий веретена деления, приводящих к дезориентации хромосом в метафазе и многополюсному и ассиметричному митозу в ана-телофазе, дает основание полагать о химическом загрязнении донных отложений реки Чумыш в районе р.п. Тальменка. Интересно отметить, что более высокий уровень патологического митоза, индуцируемый пробами осеннего периода (15,34%), также обусловлен повышением в спектре аномалий доли патологий митотического аппарата (22,9%), что подтверждает химическую природу мутагенных факторов.

ВЫВОДЫ

В результате биотестирования водных вытяжек донных отложений (ДО) р. Чумыш с использованием лука репчатого выявлено наличие в исследованных пробах компонентов токсического действия, обуславливающих депрессивный характер митотической активности апикальной меристемы тест-объекта. Частота патологических митозов, существенно превышающая фоновое значение, свидетельствует о присутствии в ДО факторов, обладающих суммарной мутагенной активностью (СМА). Согласно показателю «выраженность мутагенной активности», уровень СМА опытных проб классифицируется как «высокий». Доминирование в спектре аномалий патологий веретена деления дает основание полагать о химическом загрязнении донных отложений р. Чумыш в окрестностях р.п. Тальменка.

Стрессовые факторы, присутствующие в ДО, активизируют адаптационные механизмы клеток тест-объекта, направленные на сохранение их жизнеспособности и надёжности передачи генетической информации следующим клеточным поколениям. К числу таких адаптационных механизмов относятся формирование микроядер и полиплоидизация клеток.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Буданцев А.Ю. Измерение динамики роста корней при использовании аллиум-теста // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 6. – С. 1393 – 1396.
- Вострикова Т.В., Буторина А.К. Цитогенетические реакции берёзы повислой на действие стрессовых факторов // *Известия РАН. Серия биологическая*. – 2006. – № 2. – С. 232 – 238.
- Галахов В.П., Попов Е.С., Дмитриев В.О. Сравнительный анализ расчета максимальных снегозапасов в условиях низких гор (бассейн Чумыша) // *Известия АГУ*. – 2003. – № 3 (29). – С. 79 – 84.
- Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды в Алтайском крае в 2015 году». – Барнаул, 2016. – 167 с.
- Дубинина Л.Г. Мутагенная активность придонных отложений природных и искусственных водоемов Астраханской области // *Генетика*. – 1996. – Т. 32. – № 4. – С. 584 – 589.
- Евсеева Т.И., Майстренко Т.А., Гераськин С.А., Белых Е.С., Казакова Е.В. Токсические и цитогенетические эффекты, индуцируемые у *Allium cepa* низкими концентрациями Cd и ^{232}Th // *Цитология и генетика*. – 2005. – Т. 39. – № 5. – С. 73 – 80.
- Ерещенко О.В., Хлебова Л.П. Влияние погодных условий на изменчивость признаков пыльцы березы повислой (*Betula pendula* Roth.) // *Известия Алтайского государственного университета*. – 2012. – № 3-2. – С. 17 – 20.
- Ерещенко О.В., Хлебова Л.П. Изменение морфометрических параметров листовой пластинки березы повислой *Betula pendula* Roth. в условиях Барнаула // *Известия Алтайского государственного университета*. – 2013. – № 3-2 (79). – С. 26 – 30.
- Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. – Томск: Издательство Томского Университета, 1992. – 272 с.
- Калаев В.Н., Попова А.А. Цитогенетические характеристики и морфологические показатели семенного потомства деревьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), произрастающих на территориях с разным уровнем антропогенного загрязнения // *Вестник ВГУ*. – 2014. – № 4. – С. 63 – 72.
- Крамер Д.А. Оценка антропогенного воздействия на загрязнение донных отложений малых рек на примере г. Москвы: дис. ... к.х.н. – Москва, 2015. – 201 с.
- Лебедева Л.И., Федорова С.А., Омельяничук Л.В. Преждевременное начало телофазной реорганизации хроматина в клетках мутантной линии *fff3 Drosophila melanogaster* // *Генетика*. – 2003. – Т. 39. – № 7. – С. 1 – 8.
- Марченко Н.В. Пространственно-временная оценка генотоксического воздействия загрязнения вод природных и искусственных водоемов Нижней Волги: автореф. дис. ... к.б.н. – Астрахань, 2007. – 25 с.
- Медведева М.Ю., Болсуновский А.Я. Спектр хромосомных аберраций в корневой меристеме *E. canadensis* из районов реки Енисей с разными типами техногенного загрязнения // *Экологическая генетика*. – 2016. – Т. 14. – № 2. – С. 57 – 66.
- Прохорова И.М., Кибрик Б.С., Павлов А.В., Песня Д.С. Оценка мутагенного и митозмодифицирующего действия наночастиц серебра // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2013. – Т. 156. – № 8. – С. 223 – 228.
- Прохорова И.М., Фомичева А.Н. Патология митоза как показатель генотоксического загрязнения водоема // *Вестник Костромского государственного университета им. Н.А. Некрасова*. – 2003. – Спец. выпуск № 2. – С. 15 – 19.
- Степанова Н.Ю., Ахметшина А.Д., Латыпова В.З. Сравнение чувствительности тест-объектов при токсикологической оценке донных отложений, загрязненных нефтью разного происхождения // *Поволжский экологический журнал*. – 2012. – № 3. – С. 319 – 325.
- Томилина И.И., Иванова И.Ю., Жгарева Н.Н. и др. Оценка качества донных отложений малых рек Оренбургской области с использованием элементов триадного подхода // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. – 2008. – № 1 (17). – С. 214 – 217.
- Фомичева А.Н., Прохорова И.М., Ковалева М.И. Мутагенная активность воды р. Которосль // *Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря: Материалы VII международной научной конференции 13-14 октября 2004 г., Астрахань*. – Астрахань, 2004. – С. 128 – 130.
- Хлебова Л.П., Бычкова О.В. Особенности развития мужского гаметофита сосны обыкновенной *Pinus silvestris* L. в условиях городской среды // *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University*. – 2016. – V. 6 (1). – С. 390 – 408.
- Хлебова Л.П., Ерещенко О.В. Качество пыльцы березы повислой (*Betula pendula* Roth.) в условиях Барнаула // *Известия Алтайского государственного университета*. – 2012. – № 3-1. – С. 89 – 92.

Хлебова Л.П., Ерещенко О.В. Ритмы суточной митотической активности у березы повислой (*Betula pendula* Roth.) в условиях Алтайского края // Известия Алтайского государственного университета. – 2014. – № 3-1 (83). – С. 100 – 104.

Чернышева Н.Н., Хлебова Л.П., Пронина Р.Д. Использование тест-системы *Allium cepa* L. для оценки генотоксичности воды р. Чумыш // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2016. – № 3 (137). – С. 90 – 95.

Щербань Э.П., Арсан О.М., Шаповал Т.Н., Цветкова А.М., Пищолка Ю.К., Куляя И.Г. Методика получения водных вытяжек из донных отложений для их биотестирования // Гидробиол. журн. – 1994. – Т. 30. – № 4. – С. 100 – 111.

Barberrio A., Voltolini J.C., Mello M.L.S. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium* test // *Ecotoxicology*. – 2011. – V. 20. – P. 927 – 935.

Espinoza-Quñones F.R., Szymanski N., Palácio S.M. et al. Inhibition effect on the *Allium cepa* L. root growth when using hexavalent chromium-doped river waters // *Bull Environ Contam Toxicol*. – 2009. – V. 82. – P. 767 – 771. doi:10.1007/s00128-009-9682-z

Firbas P., Amon T. Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L. // *Caryologia*. – 2014. – V. 67(1). – P. 315 – 318.

Fiskesio G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring // *Hereditas*. – 1985. – V. 102. – P. 99 – 112.

Geras'kin S., Oudalova A., Michalik B. et al. Genotoxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas Poland by means of *Allium*-test // *Chemosphere*. – 2011. – V. 83. – P. 1133 – 1146.

Ghosh M., Chakraborty A., Bandyopadhyay M., Mukherjee A. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT): induction of DNA damage in plant and mammalian cells // *J. Hazard Mater*. – 2011. – V. 197. – P. 327 – 336. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.09.090

Goebl M., Byers B. Cyclin in fission yeast // *Cell*. – 1988. – V. 54. – P. 739 – 749.

Hayashi S. A Cdc2 dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila* // *Development*. – 1996. – V. 122. – № 2. – P. 1051 – 1058.

Leme D.M., Marin-Morales M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application // *Mutat Res*. – 2009. – V. 682 (1). – P. 71 – 81. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.00

Radić S., Stipanicev D., Vujčić V., Rajčić M.M., Sirac S., Pevalek-Kozlina B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test // *Sci Total Environ*. – 2010. – V. 408 (5). – P. 1228 – 1233. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.11.055

Salles F.J., de Toledo M.C.B., César A.C.G. et al. Cytotoxic and genotoxic assessment of surface water from São Paulo State, Brazil, during the rainy and dry seasons // *Ecotoxicology*. – 2016. – V. 25 (4). P. 633 – 645. doi:10.1007/s10646-016-1622-1

Seth C.S., Misra V., Chauhan L.K., Singh R.R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and comet assay approach // *Ecotoxicol Environ Saf*. – 2008. – V. 71 (3). – P. 711 – 716.

Silveira M., Ribeiro D., Dos Santos T.A. et al. Mutagenicity of two herbicides widely used on soybean crops by the *Allium cepa* test // *Cytotechnology*. – 2016. – V. 68 (4). – P. 1215 – 1222. doi: 10.1007/s10616-015-9881-x

Trushin M.V., Ratushnyak A.Yu., Arkharova I.A., Ratushnyak A.A. Genetic alterations revealed in *Allium cepa*-test system under the action of some xenobiotics // *World Appl. Sci. J.* – 2013. – V. 22 (3). – P. 342 – 344.

Yıldız M., Çiğerci I.H., Konuk M., Fidan A.F., Terzi H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays // *Chemosphere*. – 2009. – V. 75 (7). – P. 934 – 938. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.023

REFERENCES

- Barberrio, A., Voltolini, J.C., Mello, M.L.S. (2011). Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium* test. *Ecotoxicology*, 20, 927 – 935.
- Budancev, A.Yu. (2014). Izmerenie dinamiki rosta kornei pri ispol'zovanii allium-testa. *Fundamental'nye issledovaniya*, 6, 1393 – 1396. (in Russian)
- Chernysheva, N.N., Hlebova, L.P., Pronina, R.D. (2016). Ispol'zovanie test-sistemy *Allium cepa*L. dlya ocenki genotoksichnosti vody r. Chumysh. *Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 3 (137), 90 – 95. (in Russian)
- Dubinina, L.G. (1996). Mutagennaya aktivnost' pridonnyh otlozhenii prirodnyh i iskusstvennyh vodoemov astrahanskoi oblasti. *Genetika*, 32, 4, 584 – 589. (in Russian)
- Ereshenko, O.V., Hlebova, L.P. (2012). Vliyanie pogodnyh uslovii na izmenchivost' priznakov pyl'cy berezy povisloi (*Betula pendula* Roth.). *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3-2, 17 – 20. (in Russian)

- Ereshenko, O.V., Hlebova, L.P. (2013). Изменение морфометрических параметров листового пластинки березы повислой *Betula pendula* Roth. в условиях Барнаула. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3-2 (79), 26 – 30. (in Russian)
- Espinoza-Quiñones, F.R., Szymanski, N., Palácio, S.M. et al. (2009). Inhibition effect on the *Allium cepa* L. root growth when using hexavalent chromium-doped river waters. *Bull Environ Contam Toxicol*, 82, 767 – 671. doi:10.1007/s00128-009-9682-z
- Evseeva, T.I., Maistrenko, T.A., Geras'kin, S.A., Belyh, E.S., Kazakova, E.V. (2005). Токсические и цитогенетические эффекты, индуцируемые у *Allium cepa* низкими концентрациями Cd и ²³²Th. *Citologiya i genetika*, 39, 5, 73 – 80. (in Russian)
- Firbas, P., Amon, T. (2014). Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L. *Caryologia*, 67(1), 315 – 318.
- Fiskesio, G. (1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99 – 112.
- Fomicheva, A.N., Prohorova, I.M., Kovaleva, M.I. (2004). Мутагенная активность воды р. Которосль. *Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря*. In: Материалы V международнои научной конференции 13-14 октябрия 2004 г., Астрахан'. Астрахан'. (in Russian)
- Galahov, V.P., Popov, E.S., Dmitriev, V.O. (2003). Сравнительный анализ расчета максимальных снегозапасов в условиях низких гор (бассейн Чумыша). *Izvestiya AGU*, 3(29), 79 – 84. (in Russian)
- Geras'kin, S., Oudalova, A., Michalik, B. et al. (2011). Genotoxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas Poland by means of Allium-test. *Chemosphere*, 83, 1133 – 1146.
- Ghosh, M., Chakraborty, A., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A. (2011). Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT): induction of DNA damage in plant and mammalian cells. *J. Hazard Mater*, 197, 327 – 336. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.09.090
- Goebel, M., Byers, B. (1988). Cyclin in fission yeast. *Cell*, 54, 739 – 749.
- Gosudarstvennyi doklad «O sostoyanii i ob ohrane okruzhayushei sredy v Altaiskom krae v 2015 godu». (2016). Barnaul. (in Russian)
- Hayashi, S. (1996). A Cdc2 dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila*. *Development*, 122, 2, 1051 – 1058.
- Hlebova, L.P., Bychkova, O.V. (2016). Особенности развития мужского гаметофита сосны обыкновенной *Pinus silvestris* L. в условиях городской среды. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University*, 6 (1), 390 – 408. (in Russian)
- Hlebova, L.P., Ereshenko, O.V. (2012). Качество пыльцы березы повислой (*Betula pendula* Roth.) в условиях Барнаула. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3-1, 89 – 92. (in Russian)
- Hlebova, L.P., Ereshenko, O.V. (2014). Ритмы суточной митотической активности у березы повислой (*Betula pendula* Roth.) в условиях Алтайского края. *Izvestiya Altaiskogo gosudarstvennogo universiteta*, 3-1 (83), 100 – 104. (in Russian)
- Kalaev, V.N., Popova, A.A. (2014). Цитогенетические характеристики и морфологические показатели семени потомства дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), произрастающих на территориях с разным уровнем антропогенного загрязнения. *Vestnik VGU*, 4, 63 – 72. (in Russian)
- Il'inskih, N.N., Novickij, V.V., Vanchugova, N.N., Il'inskih, I.N. (1992). Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Издательство Томского Университета. (in Russian)
- Kramer, D.A. (2015). Оценка антропогенного воздействия на загрязнение донных отложений малых рек на примере г. Москвы: дис. ... к.х.н. Москва. (in Russian)
- Lebedeva, L.I., Fedorova, S.A., Omel'yanchuk, L.V. (2003). Прехревременное начало телофазной реорганизации хроматина в клетках мутантной линии *ff3 Drosophila melanogaster*. *Genetika*, 39, 7, 1 – 8. (in Russian)
- Leme, D.M., Marin-Morales, M.A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res*, 682 (1), 71 – 81. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.00
- Marchenko, N.V. (2007). Пространственно-временная оценка генотоксического воздействия загрязнения вод природных и искусственных водоёмов Нижней Волги: автореф. дис. ... к.б.н. Астрахан'. (in Russian)
- Medvedeva, M.Yu., Bolsunovskii, A.Ya. (2016). Спектр хромосомных aberrаций в корневой меристеме *E. canadensis* из районов реки Енисей с разными типами техногенного загрязнения. *Экологическая генетика*, 14, 2, 57 – 66. (in Russian)
- Prohorova, I.M., Fomicheva, A.N. (2003). Патология митоза как показатель генотоксического загрязнения водоёма // *Vestnik Kostromskogo gosudarstvennogo universiteta im. N.A. Nekrasova*, 2, 15 – 19. (in Russian)
- Prohorova, I.M., Kibrik, B.S., Pavlov, A.V., Pesnya, D.S. (2013). Оценка мутагенного и митозомодифицирующего действия наночастиц серебра. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i mediciny*, 156, 8, 223 – 228. (in Russian)
- Radić, S., Stipanicev, D., Vujčić, V., Rajčić, M.M., Sirac, S., Pevalek-Kozlina, B. (2010). The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Sci Total Environ*, 408(5), 1228 – 1233. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.11.055

- Salles, F.J., de Toledo, M.C.B., César, A.C.G. et al. (2016). Cytotoxic and genotoxic assessment of surface water from São Paulo State, Brazil, during the rainy and dry seasons. *Ecotoxicology*, 25 (4), 633 – 645. doi:10.1007/s10646-016-1622-1
- Seth, C.S, Misra, V., Chauhan, L.K., Singh, R.R. (2008). Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and comet assay approach. *Ecotoxicol Environ Saf*, 71 (3), 711 – 716.
- Sherban', E.P., Arsan, O.M., Shapoval, T.N., Cvetkova, A.M., Pisholka, Yu.K., Kuklya, I.G. (1994). Metodika polucheniya vodnykh vytyazhek iz donnykh otlozhenii dlya ih biotestirovaniya. *Gidrobiol. Zhurn*, 30, 4, 100 – 111. (in Russian)
- Silveira, M., Ribeiro, D., Dos Santos, T.A. et al. (2016). Mutagenicity of two herbicides widely used on soybean crops by the *Allium cepa* test. *Cytotechnology*, 68 (4), 1215 – 1222. doi: 10.1007/s10616-015-9881-x
- Stepanova, N.Yu., Ahmetshina, A.D., Latypova, V.Z. (2012). Sravnenie chuvstvitel'nosti test-ob'ektov pri toksikologicheskoi ocenke donnykh otlozhenii, zagryaznennykh neft'yu raznogo proishozhdeniya. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal*, 3, 319 – 325. (in Russian)
- Tomilina, I.I., Ivanova, I.Yu., Zhigareva, N.N i dr. (2008). Ocenka kachestva donnykh otlozhenii mal'kh rek Orenburgskoi oblasti s ispol'zovaniem elementov triadnogo podhoda. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 1 (17), 214 – 217. (in Russian)
- Trushin, M.V., Ratushnyak, A.Yu., Arkharova, I.A., Ratushnyak, A.A. (2013). Genetic alterations revealed in *Allium cepa*-test system under the action of some xenobiotics. *World Appl. Sci. J*, 22 (3), 342 – 344.
- Vostrikova, T.V., Butorina, A.K. (2006). Citogeneticheskie reakcii berezy povisloi na deistvie stressovykh faktorov. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya*, 2, 232 – 238. (in Russian)
- Yildiz, M., Ciğerci, I.H., Konuk, M., Fidan, A.F., Terzi, H. (2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, 75 (7), 934 – 938. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.023