

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА У *PINUS PALLASIANA* D. DON И *PICEA ABIES* (L.) KARST. ДЛЯ ОЦЕНИВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

И.И. КОРШИКОВ^{1,3,1}, Ю.А. БЕЛОНОЖКО^{2,2}, Е.В. ЛАПТЕВА^{3,3}

¹ Донецкий ботанический сад НАН Украины,

² ДУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»,

³ Криворожский ботанический сад НАН Украины

E-mail: ivivkor@gmail.com¹, belonjokoua@gmail.com², botgard@ukpost.ua³

Представлены данные о частоте микроядер (МЯ) в меристеме проростков *Pinus pallasiana* D. Don и *Picea abies* (L.) Karst. из природных популяций и насаждений техногенно загрязненных территорий. В контрольной популяции *P. pallasiana* клетки с МЯ встречались с частотой $0,95 \pm 0,13$ %. Увеличение доли клеток с МЯ наблюдалось в условиях интродукции и техногенного загрязнения (2,41–3,38 %). Для *P. abies* показаны подобные результаты. Отмечено различное количество МЯ в патологической клетке (1–2 для *P. pallasiana* и 1–6 для *P. abies*). Размеры МЯ варьировали от 0,13 до 14,93 % от объема основного ядра в клетках *P. pallasiana* и от 0,07 до 61,87 % *P. abies*. Выявлены многоядерные клетки и клетки с ядром неправильной формы. Установлена тесная корреляционная зависимость между цитогенетическими нарушениями и частотой МЯ ($r = 0,98$). Предлагается использовать МЯ проростков семян изученных видов для оценки генотоксичности техногенно загрязненных территорий.

Ключевые слова: *Pinus pallasiana* D. Don, *Picea abies* (L.) Karst., микроядра, микроядерный тест, биотестирование.

Введение. Возрастающее глобальное и локальное загрязнение окружающей среды — как следствие хозяйственной деятельности человека актуализирует проблему ее биотестирования на генотоксичность. Для оценки влияния химических загрязнителей окружающей среды на человека разработаны различные тест-системы [1, 2]. На протяжении уже многих лет для биомониторинга воздействия генотоксинов на человека применяется микроядерный тест (МЯТ) [3–6]. Это один из быстрых, простых, дешевых и надежных методов в системе скрининга как кластогенного эффекта,

связанного с разломом хромосом и образованием ацентрических фрагментов, так и цитогенного [7]. МЯТ широко используют для выяснения генотоксичности множественных источников загрязнения окружающей среды для живых организмов [4–11]. Считается, что микроядра (МЯ) представляют собой биомаркеры генотоксичных событий и хромосомной нестабильности. Они могут возникать во время анафазы из отстающих ацентрических хромосом или фрагментов хроматид, вызванных неправильными или невозстановленными разрывами ДНК. К образованию МЯ также может приводить сегрегация целых хромосом в анафазе в результате гипометилирования повторяющихся последовательностей в центромерной и перицентрической ДНК, дефектов в белках канетохора или в дисфункциональном веретене и дефектных генах контрольной точки анафазы [12]. Генотоксины, связываясь с молекулами ДНК вызывают повреждающую цепочку биологических изменений, связанных с нарушениями функций ферментов или общего метаболизма, проявляя цитотоксичность, имуннотоксичность, нарушения размножения, ингибирование роста и канцерогенез [11]. Образование МЯ может происходить в любой из делящихся клеток тканей любых видов [8, 13, 14]. Для оценки генотоксичности различных загрязнителей окружающей среды часто используют показатели клеток периферической крови млекопитающих, птиц, рыб, земноводных и другие живые организмы, обитающие в этой среде [15, 16].

В лабораторных экспериментах для определения генотоксичности различных веществ и элементов, например, тяжелых металлов на основе МЯ часто используют как биомаркер

Allium cepa L. [17]. Следует отметить, что семена хвойных, собранные в природных популяциях и насаждениях, подверженных влиянию аэротехногенной загрязненной среды уже давно используют для скрининга ее мутагенности, определяя в корешках проростков частоту клеток с МЯ [18]. Количество клеток с МЯ относят к наиболее чувствительным показателям у проростков *Pinus sylvestris* L. при оценке генотоксичности тяжелых металлов [19]. Несмотря на то, что МЯТ давно применяются в оценке генотоксичности загрязнителей окружающей среды, механизмы образования МЯ пока в полной мере не объяснены [20].

Для натурной оценки влияния загрязненной среды более подходят древесные растения, относящиеся к седентарным организмам, долгоживущим в самых разных местообитаниях. В ходе длительного онтогенеза они вынуждены адаптироваться к долгосрочному действию поллютантов, используя все уровни организации: от механизмов репарации ДНК до изменения жизненной формы и генетической структуры популяций. Хроническое действие загрязнителей на протяжении жизни древесных растений — длительный стресс и системный процесс, который далеко не всегда отражает простую сумму воздействия отдельных поллютантов. В таких исследованиях проблематично установить какой из ингредиентов или их сочетание индуцирует нарушения у растений. Однако, можно определить какой тип загрязнения в этом плане более опасен, сколь специфично его действие и насколько уязвим тот или иной вид растения.

Анализ изменчивости качественно-количественных характеристик МЯ в клетках семян древесных растений, произрастающих на техногенно загрязненных и нарушенных горными разработками территорий, крупнейших промышленных регионов, как например, Донбасс или Криворожье, никто не проводил. Годовой объем только статистически учитываемых аэрополлютантов в промышленных городах этих регионов огромен, и достигал, например, в Мариуполе до 1 млн. тонн. Спектр загрязняющих веществ в каждом промышленном городе различается и обусловлен специфической выбросов предприятий и относительной долей в них выхлопных газов автотранспорта.

Эта специфика также определяется присутствием в выбросах неконтролируемых санитарными службами особо опасных мутагенов, как например, бенз(а)пирена. Такие исследования нужны не только для практики мониторинга, но и для понимания специфики образования МЯ (в клетках растений), а также в их семенном потомстве.

Цель работы — сравнительный анализ изменений количества и размерности микроядер в клетках семян двух видов хвойных, подверженных влиянию разнокачественных агентов атмосферного и почвенного загрязнения среды.

Объекты и методы исследований. Объект исследований — проростки семян растений сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don). Этот вид один из наиболее распространенных интродуцентов в промышленных городах степной зоны Украины. Для выяснения влияния эколого-климатических условий района интродукции на цитогенетические показатели использовали семенное потомство *P. pallasiana* из насаждения в дендропарке Биосферного заповедника «Аскания-Нова» им. Ф.Э. Фальц-Фейна НААН Украины. Семена собраны с 20 деревьев без видимых повреждений и признаков усыхания, возрастом ≈ 30 лет. Для оценки воздействия разнокачественных по физико-химическому составу выбросов с 30–40 — летних растений из насаждений в г. Мариуполь, где доминируют выбросы крупных металлургических комбинатов; пгт. Новоамвросиевка в километровой зоне от крупнейшего в Европе Новоамвросиевского цементного завода (42,8 % выбросов пыли по Донецкой области приходится на это предприятие); г. Донецк — вдоль дороги с интенсивным движением автотранспорта. В г. Кривой Рог для исследования было выбрано насаждение, успешно произрастающее на Первомайском железорудном отвале карьера Северного горно-обогатительного комбината, где в избытке содержатся соединения железа, а также редкоземельные металлы. Во всех насаждениях семена собирали отдельно с 25–30 деревьев. В качестве контроля для *P. pallasiana* для определения естественного фона МЯ использовали семена из природной популяции Горного Крыма (район пгт. Никита), собранные с 40 деревьев возрастом от 80 до 100 лет.

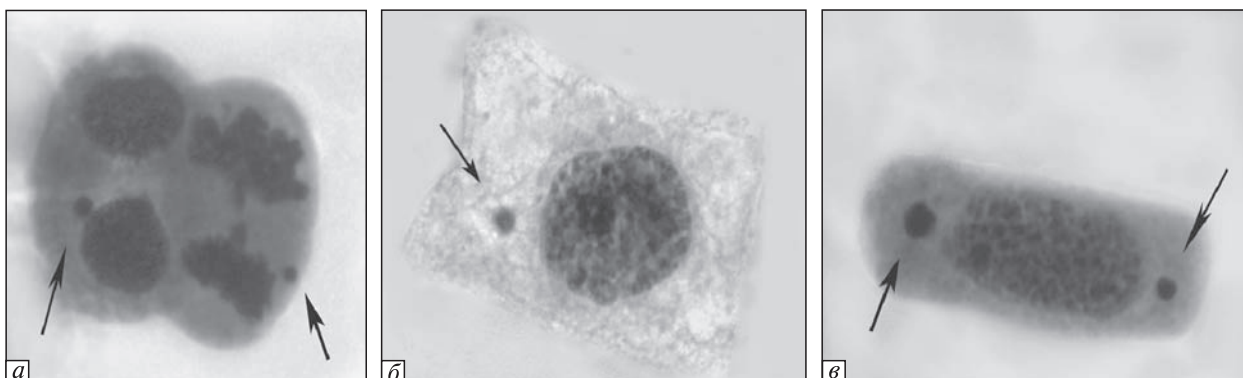


Рис. 1. Микроядра в клетках меристемы проростков семян *Pinus pallasiana* D. Доп: *a* – разорванный мост и микроядро, *б* – одно микроядро, *в* – два микроядра. (Ув. 40×10)

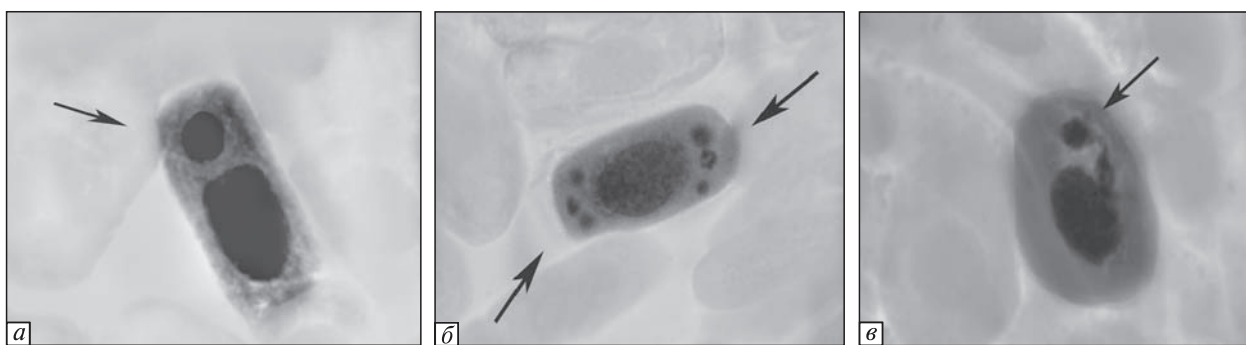


Рис. 2. Микроядра в клетках меристемы проростков семян *Picea abies* (L.) Karst.: *a* – одно микроядро, *б* – шесть микроядер, *в* – прикрепленное микроядро. (Ув. 40×10)

Также исследовали проростки семян ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) из двух природных популяций Украинского Полесья и насаждения в дендрарии Донецкого ботанического сада НАН Украины (ДБС). Популяция «Маневичи» из Маневического лесничества (Волинская обл.) расположена в области с повышенным радиоактивным фоном в результате аварии на Чернобыльской АЭС. Как контрольную рассматривали популяцию «Ростань», находящуюся в Ростанском лесничестве Волинской области, где нет избыточного радиоактивного фона.

Для анализа использовали проросшие семена без предварительной обработки. Кончики корней после окраски 1%-ным раствором ацетогематоксилина промывали водой и готовили временный препарат. Материал раздавливали в капле насыщенного раствора хлоралгидрата для усиления контраста. Из

каждого местопрорастания просмотрено по 50 проростков. В целом у проростков обоих видов просмотрено 39946 интерфазных клеток. Анализировали клетки с МЯ – округлыми образованиями с четкой границей, окрашенные в такой же тон, что и основное ядро, на расстоянии не более двух диаметров от ядра [17]. Учитывали количество клеток с МЯ, их количество в одной клетке, размеры, а также особенности морфологии. Классификацию типов МЯ проводили согласно Л.Ю. Жулевой и Н.П. Дубинину [21]. Просмотр микропрепаратов осуществляли с помощью микроскопа *Primo Star* (Carl Zeiss) при увеличении 40×10, фотографировали – с помощью цифровой камеры *Canon PowerShot A620*. Промеры осуществлялись на цифровых снимках с помощью программного обеспечения *Axio Vision Rel. 4.7* и *ImageJ 1.45s*. Статистическая обработка результатов проводилась с помо-

щью пакета статистических программ *Statistica* 7 и функций MS Excel.

Результаты исследований и их обсуждение. В клетках корневой меристемы проростков *P. pallasiana* и *P. abies* выявлены два типа МЯ – прикрепленные и изолированные (рис. 1, 2), причем последние встречались значительно чаще. В отдельных анафазных клетках *P. pallasiana* выявлены МЯ в сочетании с патологиями митоза – мостами (рис. 1, а). В интерфазных клетках этого вида обнаруживается не более двух МЯ (рис. 1, б, в), а в клетках *P. abies* – от одного до шести (рис. 2, б, в). Относительное количество клеток, содержащих одно МЯ, в проростках семян *P. pallasiana*, собранных в разных насаждениях, варьировало от 85,7 до 91,8 %, а у *P. abies* – 80,3–98,1 %. Наибольшее число клеток с двумя и более МЯ выявлено в популяции *P. abies* «Маневичи» – 19,7 %, загрязненной радионуклидами.

МЯ встречались и в клетках проростков семян из контрольных популяций *P. pallasiana* и *P. abies* с частотой 0,95 и 1,34 соответственно (табл. 1). Однако у семенного потомства растений, которые произрастают в условиях техногенно загрязненной и нарушенной среды, доля клеток с МЯ существенно выше.

В случае *P. abies* количество клеток с МЯ превышало фоновый уровень природной популяции («Ростань») в 1,6 раза в «Маневичах» и в 1,9 раза в ДБС. У *P. pallasiana* клетки с МЯ наиболее часто встречались у семенного потомства растений железорудного отвала: в 4 раза выше, чем у семян растений крымской популяции. Для других вариантов исследований этого вида превышение в сравнении с естественным фоном было таким: г. Мариуполь – 3 раза, г. Донецк – 2,5 и пгт. Новоамвросиевка – 1,8. Наименьшее количество клеток с МЯ отмечено в насаждении из дендропарка «Аскания-Нова».

Хроническое влияние малых доз радиации вызывает меньший уровень патологий с возникновением МЯ у семенного потомства *P. abies*, чем влияние загрязненности почвенного субстрата и воздуха техногенными ингредиентами. Хотя это может быть обусловлено и разной видовой чувствительностью на влияние разных загрязнителей. Следовательно, у растений, произрастающих на субстрате железорудного отвала или вблизи предприятий черной металлургии, в аэрозолях и пыли которых содержатся тяжелые металлы, эти цитогенетические нарушения встречаются чаще,

Таблица 1. Количество клеток с микроядрами в меристеме проростков семенного потомства *Picea abies* (L.) Karst. и *Pinus pallasiana* D. Don из природных популяций и насаждений техногенно загрязненных территорий

Место произрастания	Количество клеток, шт.		Доля клеток с микроядрами, %	Количество микроядер в аберрантной клетке			
	всего	с микроядрами		min	%	max	%
<i>Pinus pallasiana</i> D. Don							
Горный Крым	5153	49	0,95 ± 0,13	1	91,8	2	8,2
«Аскания-Нова»	4972	42	0,84 ± 0,12	1	85,7	2	14,3
Новоамвросиевка	4314	75	1,72 ± 0,19***	1	89,3	2	10,6
Донецк	4686	113	2,41 ± 0,22***	1	87,6	2	12,4
Мариуполь	4491	126	2,81 ± 0,24***	1	89,7	2	10,3
Кривой Рог	5145	197	3,83 ± 0,27***	1	91,7	2	7,2
<i>Picea abies</i> (L.) Karst.							
Ростань	6031	81	1,34 ± 0,14	1	98,1	2	1,9
Маневичи	5008	106	2,12 ± 0,19***	1	80,3	6	1,2
Дендрарий ДБС	5118	130	2,54 ± 0,17***	1	93,8	3	0,8

Примечание: отличия от контроля достоверны при *** – P ≤ 0,999.

чем у проростков семян растений, подверженных острому воздействию выбросов цементного завода, где эти элементы присутствуют в заметно меньших количествах. При этом исследуемые растения хотя и находятся в хорошем жизненном состоянии — у них практически отсутствуют признаки угнетения и повреждения, образование МЯ в клетках их семенного потомства указывает на активацию в них процессов апоптоза. У обоих видов максимальное количество МЯ отмечено у семенного потомства насаждений, у которых ранее установлен максимальный уровень патологий митоза [22]. По результатам корреляционного анализа можно утверждать, что между увеличением количества МЯ и цитогенетических нарушений в клетках корневой меристемы семенного потомства исследованных выборок *P. pallasiana* и *P. abies* наблюдается тесная линейная зависимость ($r = 0,98$).

Размеры МЯ в интерфазных клетках потомства *P. pallasiana* и *P. abies* варьируют заметно существеннее, чем их количество. Наиболее значительно размер МЯ изменялся в клетках семенного потомства крымской популяции *P. pallasiana* и насаждений из «Аскания-Нова»: от 0,15 до 14,93 % диаметра основного ядра (табл. 2). Близкие значения размеров МЯ отмечены в клетках проростков *P. pallasiana*,

из семян насаждений степной зоны, что может свидетельствовать о схожести развития патологий, которые предшествуют микронуклеации. В клетках семенного потомства *P. abies* также отмечены как достаточно мелкие МЯ, размер которых не превышает 0,07 % размера основного ядра, так и достаточно крупные — до 61,87 %. Наиболее крупные МЯ наблюдались в популяции «Маневичи». Размерность МЯ, как мониторинговый показатель генотоксичности загрязнений среды, заметно менее информативен, чем доля интерфазных клеток с МЯ в семенном потомстве обоих видов.

Размеры МЯ в клетках семенного потомства пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) варьировали в пределах 14,7–23,5 % диаметра основного ядра. В отдельных случаях выявлены крупные МЯ до 60,9–69,4 % [23].

В сравнительных исследованиях частоты встречаемости клеток с МЯ у проростков семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и лиственницы Сукачева (*Larix sucaszewii* Dyl.), произрастающих на территории г. Воронежа и далеко за его пределами установлено, что в первом случае доля таких клеток составила 0,2 и 0,4 %, а во втором — 0,05 и 0,06 % соответственно [24]. Увеличение количества клеток с МЯ отмечено у семян усыхающих деревьев *A. sibirica* — до 0,2 % в сравнении с

Таблица 2. Морфометрические характеристики микроядер в меристеме проростков семенного потомства *Picea abies* (L.) Karst. и *Pinus pallasiana* D. Don из природных популяций и насаждений техногенно загрязненных территорий

Место произрастания	Размер микроядер ¹			
	среднее	min	max	CV, %
<i>Pinus pallasiana</i> D. Don				
Горный Крым	1,49 ± 0,35	0,15	14,48	191,2
«Аскания-Нова»	2,73 ± 0,50**	0,15	14,93	140,7
Новоамвросиевка	2,59 ± 0,38*	0,13	12,50	122,1
Донецк	1,17 ± 0,21	0,13	9,41	144,6
Мариуполь	1,07 ± 0,21	0,14	9,41	162,4
Кривой Рог	2,35 ± 0,40	0,19	14,16	120,4
<i>Picea abies</i> (L.) Karst.				
Ростань	5,59 ± 1,43	0,12	39,73	182,8
Маневичи	5,77 ± 1,28	0,07	61,87	179,5
Дендрарий ДБС	5,30 ± 1,64	0,12	54,38	220,8

Примечание: ¹ — % от объема основного ядра отличия от контроля достоверны при * — $P \leq 0,95$.



Рис. 3. Патологии ядра в меристеме проростков семян *Pinus pallasiana* D. Don и *Picea abies* (L.) Karst.: а, б – многоядерные клетки, в – клетка с ядром неправильной формы. (Ув. 40×10)

семенами здоровых деревьев (0,03–0,1 %). В каллусных культурах кормовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) клетки с МЯ на стадии интерфазы встречались с частотой 2–3 % [25].

МЯ образуются в интерфазе митоза из опаздывающих ацентрических фрагментов хромосом. Они задерживаются на экваторе клетки, в метафазе и в ходе митоза попадают в одну из дочерних клеток, что хорошо видно на рисунке 1, а. Фрагменты могут включаться в основное ядро или трансформироваться в одно или несколько мелких МЯ, которые могут быть образованы и из целой хромосомы из-за нерасхождения, вызванного дефектами веретена деления. Образование МЯ и многополюсные митозы обуславливают нарушение сегрегации хромосом между дочерними клетками и создают возможность развития анеуплоидии [25]. Нередко при введении в клеточную культуру растительные клетки теряют генетическую стабильность, что приводит к формированию высокого уровня полиплоидии и анеуплоидии [26]. Исследования патологий митоза у семенного потомства *P. pallasiana* и *P. abies* из насаждений, представленных в этой работе, показали, что такая аномалия как многополюсность встречалась крайне редко [22]. Однако именно это нарушение клеточного деления может приводить к многоядерности.

При проведении МЯТ для оценки влияния загрязняющих веществ на живые организмы обнаружены другие ядерные аномалии (ядерные протрузии, многоядерные клетки, апоптические ядра) [17, 27, 28]. В корешках про-

ростков *P. pallasiana* и *P. abies* нами обнаружены многоядерные клетки (рис. 3, а, б), а также выявлены клетки с неправильной формой ядра (рис. 3, в).

Двухядерные клетки с частотой 0,5 % встречались в каллусных культурах *B. vulgaris* как в обработанных токсичными концентрациями минеральных солей, так и с близкой частотой в контрольном варианте [25]. Повышение числа двухядерных клеток выявлено в корешках проростков лука батун (*Allium fistulosum* L.), при действии разных концентраций пентахлорфенола и трихлорфенола [29]. У потомства *P. pallasiana* и *P. abies* многоядерные клетки, а также клетки с неправильной формой ядра отмечены как единичные случаи, и использовать их в цитогенетическом мониторинге влияния загрязненности среды на семенное потомство изучаемых видов можно только в широком комплексе с другими патологиями. Механизмы возникновения двухядерных клеток могут быть разными: как компенсация на действие генотоксических агентов, так и следствие старения и удлинения продолжительности цитокинеза [30, 31].

Возможной причиной избыточного образования МЯ в клетках проростков семян *P. pallasiana* и *P. abies* могут быть связаны с цитогенетическими нарушениями в ходе мейоза. У растений из насаждений техногенно загрязненных территорий заметно возрастает доля аномальной пыльцы [32]. Фертильность пыльцы прямо или косвенно зависит от угнетенности метаболических процессов растений и отражается на жизнеспособности их се-

мян. Установлено, что нарушения в мейозе сопровождаются различными цитогенетическими аномалиями, включая образование МЯ [33].

Цитогенетические нарушения у семенного потомства древесных растений связаны с экологическими условиями их мест произрастания. Однако видовая чувствительность на влияние загрязненной среды разная: один и тот же вид отличается спектром и уровнем цитогенетических нарушений в зависимости от типа загрязнения [22, 34], что и подтвердили данные МЯТ у проростков *P. pallasiana* и *P. abies*. В случае аэротехногенного загрязнения сложно выделить отдельные ингредиенты как возможные индукторы цитогенетических нарушений. В приземных слоях воздуха качественно-количественное соотношение загрязнителей крайне нестабильно. Выявленные цитогенетические нарушения у проростков *P. pallasiana* и *P. abies* из семян растений загрязненных территорий фактически являются интегральной оценкой генотоксичности существующих типов загрязнения. Наличие большого количества клеток с МЯ обнаружено у проростков *P. pallasiana* из насаждений загрязненных территорий, где в субстрате или воздухе в избыточных количествах содержатся тяжелые металлы. Очевидно это последствие стресса материнских растений. На примере сосны обыкновенной (*P. sylvestris*) из Чернобыльской зоны показано, что одним из механизмов защиты растений от радиоактивного излучения являются эпигенетические изменения – значительное гиперметилирование геномной ДНК. Это рассматривается как стратегия защиты растений от стресса, препятствующая нестабильности генома [35]. Долгосрочное действие экологического стресса в случае с *P. pallasiana* и *P. abies* на техногенно загрязненных территориях проявляется в их проростках через дисфункцию ряда генов, регулирующих митоз в отдельных клетках, вследствие чего образуются МЯ. У видов рода *Allium* L. клетки с МЯ характеризовались низкой митотической активностью и пониженной жизнеспособностью [17].

Данные о корреляции между частотой встречаемости врожденных пороков развития у новорожденных детей и частотой нарушений митотического аппарата у древесных растений

[18] позволяют говорить о перспективности использования цитогенетических показателей семенного потомства древесных растений, в частности уровня патологических митозов, ядерно-ядрышкового соотношения, встречаемости клеток с МЯ для оценки загрязнения окружающей среды и, возможно, прогноза генетического риска для человека [18, 32, 36].

Таким образом, у семенного потомства растений *P. pallasiana*, произрастающих на субстратах железорудного отвала Криворожья, подверженных воздействию выбросов крупных промышленных предприятий Донбасса с разным физико-химическим составом загрязнителей, отмечается существенное увеличение интерфазных клеток с МЯ, как у потомства *P. abies*, произрастающей на загрязненной территории. *P. pallasiana* может быть рекомендован для выявления экологозависимых цитогенетических изменений в промышленных районах и урбанизированных территориях для оценки качества окружающей среды по генотоксическому фону на основе МЯТ.

USING MICRONUCLEUS TEST IN *PINUS PALLASIANA* D. DON AND *PICEA ABIES* (L.) KARST. TO ASSESS THE INFLUENCE OF TECHNOGENIC POLLUTION

I.I. Korshikov, Yu.A. Belonozhko, E.V. Lapteva

Donetsk Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine,
SI «Institute of Food Biotechnology and Genomics»,
NAS of Ukraine
Kryvyi Rih Botanical Garden, NAS of Ukraine
E-mail: ivivkor@gmail.com, belonojkoua@gmail.com,
botgard@ukpost.ua

The results of the study on the frequency of micronuclei (MN) in the meristem of seedlings of *Pinus pallasiana* D. Don and *Picea abies* (L.) Karst. from natural populations and plantings of technogenic polluted territories are presented. The level of cells with MN was $0,95 \pm 0,13$ % in the control population of *P. pallasiana*. An increase in the level of cells with MN was observed in the conditions of introduction and technogenic pollution (2,41–3,38 %). Similar results are shown for *P. abies*. The pathological cell contained a different amount of MN (from 1 to 2 for *P. pallasiana* and from 1 to 6 for *P. abies*). The size of the MN varied from 0,13 to 14,93 % from the diameter of the main nuclei in *P. pallasiana* cells and from 0,07 to 61,87 % in *P. abies*. Multinuclear cells and cells with an irregular shape nucleus were observed. Correlation dependence

was established between cytogenetic disorders and MN frequency ($r = 0.98$). It is proposed to use the MN of seedlings of studied species to assess the genotoxicity of technogenic polluted areas.

ВИКОРИСТАННЯ МІКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА
У *PINUS PALLASIANA* D. DON ТА *PICEA ABIES*
(L.) KARST. ДЛЯ ОЦІНЮВАННЯ ВПЛИВУ
ТЕХНОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ

I.I. Коршиков, Ю.О. Білоножко, О.В. Лантєва

Представлено дані про частоту микроядер (МЯ) в меристемі проростків *Pinus pallasiana* D. Don і *Picea abies* (L.) Karst. з природних популяцій і насаджень техногенно забруднених територій. У контрольній популяції *P. pallasiana* клітини з МЯ зустрічалися з частотою $0,95 \pm 0,13$ %. Збільшення частки клітин з МЯ спостерігалось в умовах інтродукції та техногенного забруднення (2,41–3,38 %). Для *P. abies* показані подібні результати. Виявлено різну кількість МЯ в патологічній клітині (1–2 для *P. pallasiana* і 1–6 для *P. abies*). Розміри МЯ варіювали від 0,13 до 14,93 % від об'єму основного ядра в клітинах *P. pallasiana* і від 0,07 до 61,87 % *P. abies*. Спостерігалися багатоядерні клітини і клітини з ядром неправильної форми. Встановлено щільну кореляційну залежність між цитогенетичними порушеннями і частотою МЯ ($r = 0,98$). Пропонується використовувати МЯ проростків насіння вивчених видів для оцінки генотоксичності техногенно забруднених територій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Yemets, A.I., Blume, R.Ya., and Sorochinsky, B.V., Adaptation of the gymnosperms to the conditions of irradiation in the Chernobyl zone: from morphological abnormalities to the molecular genetic consequences, *Cytol. Genet.*, 2016, vol. 50, no. 6, pp. 415–9. doi:10.3103/S0095452716060086.
2. Kurinny, D.A., Kostikov, I.Yu., Co-cultivation of unicellular green algae (Chlorophyta, Chlorophyceae) and lymphocytes of peripheral blood of humans as a test system for radiobiological studies, *Inter. J. Algae*, 2017, vol. 19, no. 2, pp. 163–72. doi: 10.1615/InterJAlgae.v19.i2.60.
3. Decordier, I., Papine, A., Vande-Loock, K., Plas, G., Soussaline, F. and Kirsch-Volders M., Automated image analysis of micronuclei by IMSTAR for biomonitoring, *Mutagenesis*, 2011, vol. 26, no. 1, pp. 163–8. doi: 10.1093/mutage/geq063.
4. Hussain, B., Sultana, T., Sultana, S., Al-Ghanim, K.A., Masood, Sh., Ali, M. and Mahboob, Sh., Micro-electrophoretic study of environmentally induced DNA damage in fish and its use for early toxicity screening of freshwater bodies, *Environ. Monit. Assess.*, 2017, vol. 189, pp. 115–26. doi: 10.1007/s10661-017-5813-x.
5. Rocha, C.A., Cunha, L.A., Pinheiro, R.H., Bahia, M.O., and Burbano, R.M. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury, *Genet. Mol. Biol.*, 2011, vol. 34, no. 4, pp. 694–7. doi: 10.1590/S1415-47572011000400024.
6. Chang P., Li, Ya., and Li, D., Micronuclei levels in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker for pancreatic cancer risk, *Carcinogenesis*, 2010, vol.32, no. 2, pp. 210–5. doi: 10.1093/carcin/bgq247.
7. Güez, C.M., Waczuk, E.P., Pereira, K.B., Querol, M.V., Rocha, J.B., and Oliveira, L.F., In vivo and in vitro genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*, *Brazil. J. Pharmaceut. Sci.*, 2012, vol. 48, no. 3, pp. 461–7. doi:10.1590/S1984-82502012000300013.
8. Braham, R.P., Blazer, V.S., Shaw, C.H., and Mazik, P.M. Micronuclei and other erythrocyte nuclear abnormalities in fishes from the Great Lakes Basin, USA, *Environ. Mol. Mutagen.*, 2017, vol. 58, no. 8, pp. 570–81. doi: 10.1002/em.22123.
9. Kanev, M., Özdemir, K., and Gökalp, F., Genotoxic evaluation of the Ergene River, Turkey, on mosquito fish, *Gambusia affinis* (Baird and Girard, 1853) using the piscine micronucleus assay, *Int. J. Aquat. Biol.*, 2016, vol. 4, pp. 330–9. doi: 10.22034/ijab.v4i5.171.
10. Kumar, M.K., Avelyno, S. and Shyama K., Genotoxic biomarkers as indicators of marine pollution, *Marine Pollution and Microbial Remediation*, *Springer, Singapore*, 2017, pp. 263–70. doi: 10.1007/978-981-10-1044-6_17.
11. Baršienė, J., Andreikėnaitė, L., and Bjornstad, A., Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in blue mussels *Mytilus edulis* after 1-, 2-, 4- and 8-day treatment with crude oil from the North Sea, *Ekologija*, 2010, vol. 56, no. 3–4, pp. 124–31. doi: 10.2478/v10055-010-0018-4.
12. Fenech, M., Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells, *Mutagenesis*, 2011, vol. 26, pp. 125–32. doi: 10.1093/mutage/geq052.
13. Andrade, V.M., Silva, J.D., Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L. and Freitas, T.R., Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test, *Environ. Mol. Mutagen.*, 2004, vol. 44, no. 5, pp. 459–68. doi: 10.1002/em.20070.
14. Boriollo, M.F., Resende, M.R., Silva, T.A., Púbblio, J.Yo., Souza, L.S., Dias, C.T., de Mello Silva Oliveira, N., and Fiorini, J.E., Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart. bark in the micronucleus assay, *Genet. Mol. Biol.*, 2014, vol. 37, no. 2, pp. 428–38. doi: 10.1590/S1415-47572014000300016.
15. Saleh, K. and Sarhan, M.A., Clastogenic analysis of chicken farms using micronucleus test in peripheral blood, *J. Appl. Sci. Res.*, 2007, vol. 3, no. 12, pp. 1646–9.

16. Martínez-Haro M., Balderas-Plata, M.A., Pereda-Solís, M.E., Arellano-Aguilar, O., Hernández-Millán, C.L., Mundo-Hernández, V., Torres-Bugarín, O., Anthropogenic influence on blood biomarkers of stress and genotoxicity of the burrowing owl (*Athene cunicularia*). *J. Biodivers Endanger Species*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 196–9. doi: 10.4172/2332-2543.1000196.
17. Wang, Q.L., Zhang, L.T., Zou, J.H., Liu, D.H., and Yue, J.Y., Effects of cadmium on root growth, cell division and micronuclei formation in root tip cells of *Allium cepa* var. *agrogarum* L., *Fyton*, 2014, vol. 83, pp. 291–8.
18. Kalaev, V., Artyukhov, V., and Nechaeva, M., Micronucleus test of human oral buccal epithelium: problems, progress and prospects, *Cytol. Genet.*, 2014, vol. 48, no. 6, pp. 62–80. doi: 10.3103/S0095452714060061.
19. Belousov, M.V., Mashkina, O.S., and Popov, V.N., Cytogenetic response of Scots pine (*Pinus sylvestris* Linnaeus, 1753) (Pinaceae) to heavy metals, *Comp. Cytogenet.*, 2012, vol. 6, no. 1, pp. 93–106. doi: 10.3897/CompCytogen.v6i1.
20. Gökalp, F.D., and Güner, U., Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin, *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis*, 2011, vol. 726, pp. 104–8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.05.004.
21. Zhuleva, L.Yu., and Dubinin, N.P., Use of the micronucleus test for assessing the ecological situation in regions of the Astrakhan district, *Genetika*, 1994, vol. 30, no. 7, pp. 999–1004 (in Russian).
22. Korshikov, I.I., Tkacheva, Yu.A., and Privalikhin, S.N., Cytogenetic abnormalities in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seedlings from natural populations and an introduction plantation, *Cytol. Genet.*, 2012, vol. 46, no. 5, pp. 280–4. doi: 10.3103/S0095452712050064.
23. Goryachkina, O.V., Sizikh, O.A., Cytogenetical reactions of conifer trees in antropogenous disturbed regins of Krasnoyarsk and its environs, *Khvoynyye boreal'noy zony*, 2012, vol. 30, no. 1–2, pp. 46–51 (in Russian).
24. Belousov, M.V., Mashkina, O.S., Cytogenetic response of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) to cadmium and nickel, *Tsitologiya*, 2015, vol. 57, no. 6, pp. 459–64 (in Russian).
25. Dubrovna, O.V., Tsytohenetychniy efekt diyi NaCl ta Na2SO4 na kalyusni kul'tury kormovoyih buryakiv, *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnikh rasteniy*, 2005, vol. 37, no. 1, pp. 30–9 (in Ukrainian).
26. Kunakh, V.A., Mechanisms and some regularities to somaclonal variability of the plants, *Visnyk ukrayins'koho tovarystva henetykiv i seleksioneriv*, 2003, vol.1, no. 1, pp. 101–6 (in Ukrainian).
27. Bonassi, S., Coskun, E., Cerpi, M., Lando, C., Bologna, C., Burgaz, S. and Fenech, M., The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells: The role of lifestyle, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol, *Mutation Research/ Rev. Mutat. Res.*, 2011, vol. 728, pp. 88–97. doi: 10.1016/j.mrrev.2011.06.005.
28. Torres-Bugarín, O., Pacheco-Gutiérrez, A.G., Vázquez-Valls, E., Ramos-Ibarra, M.L., and Torres-Mendoza, B.M., Micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa cells in patients with anorexia and bulimia nervosa, *Mutagenesis*, 2014, vol. 29, no. 6, pp. 427–31. doi: 10.1093/MUTAGE/GEU044.
29. Vergolyas, M.R., Lutsenko, T.V., and Goncharuk, V.V., Cytotoxic effect of chlorophenols on cells of the root meristem of welsh onion (*Allium fistulosum* L.) seeds, *Cytol. Genet.*, 2013, vol. 47, no. 1, pp. 34–8. doi: 10.3103/S0095452713.
30. Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surrallés, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P., Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells, *Mutagenesis*, 2011, vol. 26, no. 1, pp. 125–32. doi: 10.1093/mutage/geq052.
31. Luzhna, L., Kathiria, P., and Kovalchuk, O., Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond, *Front Genet.*, 2013, vol. 4, pp. 131–48. doi: 10.3389/fgene.2013.00131.
32. Korshikov, I.I., Lapteva, H.V., and Belonozhko, Yu.A., Pollen quality and cytogenetic changes of scots pine as indicators of the effect of technogenic environmental pollution of Krivoy Rog, *Contemporary Problems of Ecology*, 2015, vol. 8, no. 2, pp. 250–5. doi: 10.1134/S1995425515020109.
33. Bajpai, A., and Singh, A.K., Meiotic Behavior of *Carica papaya* L.: spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in North Indian conditions, *Cytologia*, 2006, vol. 71, no. 2, pp. 131–6. doi: 10.1508/cytologia.71.131.
34. Kalashnik, N.A., Chromosome aberrations as indicator of technogenic impact on conifer stands, *Russ. J. Ecol.*, 2008, vol. 39, no. 4, pp. 261–71. doi: 10.1134/S106741360804005X.
35. Kovalchuk, O., Burke, P., Arkhipov, A., Kuchma, N., James, S.J., Kovalchuk, I., Pogribny, I., Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl: mechanism for radiation adaptation?, *Mutat. Res.*, 2003, vol. 529, no. 1–2, pp. 13–20. doi:10.1016/S0027-5107(03)00103-9.
36. Korshikov, I.I., Lapteva, Ye.V., and Tkachova, Yu.A., Variation in quantitative characteristics of nucleoli and nuclei in seed cells of *Pinus pallasiana* D. Don (protected and human disturbed areas in the steppe zone of Ukraine), *Ukr. Bot. J.*, 2013, vol. 70, no. 6, pp. 805–12 (in Ukrainian).

Поступила в редакцию 22.03.18
 После доработки 23.05.18
 Принята к публикации 18.03.19