

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТОКСИЧНОСТТА НА ТЕЖКИ МЕТАЛИ  
ПРИ ГРАХ (*Pisum sativum* L.) С ИЗПОЛЗВАНЕ  
НА РАЗЛИЧНИ ВИДОВЕ ТЕХНИКИ**

Сп. Новева, Н. Лазарова, Ат. Механджиев, Г. Костуркова  
Институт по генетика, БАН, Софи

**Резюме**

Новева С., Н. Лазарова, Ат. Механджиев, Г. Костуркова. 2006. Изследване на токсичността на тежки метали при грах (*Pisum sativum* L.) с използване на различни видове техники

Проучен е цитогенетичният ефект на оловото при грах *P. sativum* L. – сорт „**Ран 1**”. Третирането с  $Pb(NO_3)_2$  при концентрации 1.5; 3.0 и 4.5 mM предизвиква различни нарушения. Аберациите са с честота до 5 пъти по-висока от тази в контролата. Клетъчното делене се инхибира като митотичният индекс е над 4 пъти по-нисък от този на контролата. Депресията при нарастване на корена е по-силна от тази при нарастване на стеблото на 14-дневни растения. Изследвани са ултраструктурните промени в клетките на кореновата меристема на същия сорт при третиране с  $PbCl_2$  в концентрации 0.75, 1.50 и 3.00 mM. При концентрация 1.50 mM  $PbCl_2$ , се наблюдава се предпазна бариера, съхраняваща функциите на зоната на нарастване на корена като отговор-адаптация на токсичността на тежкия метал. Изследван е ефекта на  $MgSO_4$  в концентрации 0.25-10 mM върху развитието на *in vitro* култури. Депресията на калусния растеж при ниските концентрации (0.25-0.75 mM) на медните йони е лека. При високи концентрации (5 mM) растежът намалява два пъти, а при 10 mM спира напълно. При органогенните култури потискащият ефект е по отношение както на мултиплицирането на пъпките, така и на растежа им. Сублеталната концентрация  $LD_{50}$  е също около 5 mM.

**Ключови думи:** Коренова меристема – Грах – Токсичност - Тежки метали – Pb соли – Cu соли – Аберации – Митотичен индекс – Депресия - Клетъчна ултраструктура - Предпазна бариера — *In vitro* култури

**Abstract**

Noveva S., N. Lazarova, At. Mehandjiev, G. Kosturkova, 2006. Investigations on heavy metal toxicity in pea (*Pisum sativum* L.) using different types of techniques.

The cytogenetical effect of plumbum on pea *P. sativum* L. – c.v. “**Ran 1**” was investigated. The treatment with  $Pb(NO_3)_2$  in concentrations of 1.5; 3.0 and 4.5 mM caused different abnormalities. Aberrations were with high frequency (up to 5 folds higher than that of the control). Cell division was inhibited, mitotic index being four times lower than that of the control. Depression on the root growth was higher than stem growth of 14 days old plants. Ultrastructural changes in root meristem cells treated with 0.75, 1.50 and 3.00 mM  $PbCl_2$

were investigated. Formation of a protection barrier was observed after treatment with 1.50 PbCl<sub>2</sub>. Probably this is an adaptation response to the heavy metal toxicity for protection of the developing root zone. The effect of MgSO<sub>4</sub> on the development of *in vitro* cultures was studied. Depression of calli growth at low concentrations (0.25-0.75 mM) was low. Higher concentrations (5 mM and 10 mM) caused double decrease or complete suppression of growth, respectively. Suppression effect in organogenic cultures was registered both in multiplication of buds, and on their growth. Sublethal concentration LD<sub>50</sub> was also about 5 mM.

**Key words:** Root meristem – Pea – Heavy metals – Toxicity – Pb salts – Cu salts – Aberrations: Mitotic index – Depression – Cell ultrastructure – Protective barrier – *In vitro* cultures

## УВОД

Един от най-тежките глобални проблеми на съвременната цивилизация е мащабното антропогенно замърсяване в индустриалните райони с тежки метали, в резултат на което настъпва киселяване и деструкция на почвите и те стават токсични за нормалното отглеждане на растенията. Този, както и други проблеми на абиотичния стрес имат комплексен характер и към решаването им се прилага мултидисциплинарен подход, включително и създаване на моделни системи (Kosturkova et al, 2003; 2004). В тази връзка в Институт по генетика се тестват различни сортове грах и други растения, за да се намерят най-толерантните, необходими за отглеждане на замърсени почви. Цели се да се намери оптимален вариант, за да не се допусне попадането на тежките метали по хранителната верига в човешкият организъм, където те предизвикват тежки заболявания, понякога с летален край. В този аспект за изясняване на въздействието на различни тежки метали са направени и настоящите цитогенетични, структурни и ултраструктурни изследвания на коренова меристема на грах (*Pisum sativum* L.), както и *in vitro* опити за моделиране на стреса.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Цитогенетичните и светлинномикроскопски изследвания са проведени с градински грах – сорт “**Ран 1**”. Семената са поставяни за покълване в термостат при температура 24°C. След 48 h. покълналите семена са прехвърляни в кристализатори, където само коренчетата са потопени в разтвор. В тях е проведено 24 часово третиране с Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> в три концентрации – 1.5, 3.0 и 4.5 mM. След това на една част от материала са проведени цитологични изследвания, а другата е оставена за проследяване на първоначалния растеж и развитие на растенията. При цитологичните изследвания е приложен анафазен анализ. Цитогенетичният ефект от действието на оловото е оценяван въз основа на честотата и спектъра на индуцираните хромозомни аберации в кореновата меристема на граха. За установяване влиянието на оловото върху първоначалния растеж и развитие на младите растения са измервани височината и теглото на стъблата, както и дължината и теглото на корените на 14-дневни растения.

За обект на ултраструктурните изследвания е използван същият градински грах, сорт “**Ран 1**”, с третиране на коренчета с концентрации 0,75, 1,50 и 3,00 mM PbCl<sub>2</sub>. Материалите са обработени по рутинна методика за електронна микроскопия – двойна фиксация с глутаралдехид и осмиев тетроксид на фосфатен буфер с последващо дехидратиране в серия етанол и пропиленоксид и включване в Епон 812 по наша модифицирана методика (Lazarova & Mehandjiev, 2000; Weakly, 1972). Ултраструктурните срези са контрастирани с уранилацетат и оловен цитрат. Препаратите са заснети на електронен микроскоп Tesla BS-500.

В експериментите *in vitro* бе изследвано влиянието на медните йони върху нарастването на калусни и органогенни култури от грах, за което късчета от калус или тупички от пъпки със средно тегло 50 mg бяха залагани на среди за развитие описани по-рано (Kosturkova et al, 2003). Към средата бе добавян разтвор на меден сулфат  $\text{CuSO}_4$ , така че крайната концентрация на медните йони ( $\text{Cu}^{2+}$ ) в един литър среда да бъде в диапазон 0.25-5 mM. Култивирането е описано по-рано (Kosturkova et al, 2003). Нарастването бе определено на 20-тия ден.

## РЕЗУЛТАТИ

На таблици 1 и 2 са представени резултатите от оценката на цитотоксичността на  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Може да се проследи изменението на митотичната активност на клетките под въздействието на оловото в трите концентрации. Митотичният индекс (табл. 1) при контролата е 13.95%, а при най-високата концентрация 4.5 mM е 3.21%, т.е. той е над 4 пъти по-нисък.

**Таблица 1.** Митотичен индекс при въздействие с  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  при грах, сорт "Ран 1"  
**Table 1.** Mitotic index after treatment with  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  in pea cv. "Ran 1"

Вариант Variants	Изследвани клетки (бр.) Total cells	Делящи се клетки (бр.) Dividing cells	Митотичен индекс (%) MI (%)
Контрола Control	16200	2260	13.95
Pb 1.5 mM	16635	1454	8.74
Pb 3.0 mM	15351	832	5.42
Pb 4.5 mM	14909	478	3.21

**Таблица 2.** Честота на хромозомните аберации при въздействие с  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  при грах, сорт "Ран 1"

**Table 2.** Frequency of chromosomal aberrations induced after treatment with  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  in pea cv. "Ran 1"

Вариант Variants	Бр. анафазни клетки Number of cells with anaphases	Анафази с аберации Anaphases with aberrations							
		Общ бр. клетки с аберации Total cells with aberrations		Мостове Bridges		Фрагменти Fragments		Клетки с други аберации Cells with other aberrations	
		Бр. No.	%	Бр. No.	%	Бр. No.	%	Бр. No.	%
Контрола Control	1350	30	2.22	3	0.22	20	1.48	7	0.52
Pb 1.5 mM	2554	146	5.72	46	1.80	36	1.41	64	2.51
Pb 3.0 mM	2736	216	7.89	54	1.97	90	3.29	72	2.63
Pb 4.5 mM	4090	430	10.51	73	1.78	130	3.18	227	5.55

Честотата на хромозомните аберации (табл. 2) нараства с увеличаване концентрацията на  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Анафазите с аберации в контролата са 2.22%, а при варианта с най-високата концентрация 4.5 mM – те са 10.51%, т.е. около 5 пъти нараства процента на анафазните клетки с аберации. Както се вижда от таблицата в

спектъра, хромозомните аберации са представени основно от фрагменти и мостове. Основният дял принадлежи на клетките с фрагменти. Значително висок е и относителният дял на клетките с други типове аберации (изоставащи хромозоми, мостове с фрагменти и др.).

**Таблица 3.** Влияние на Pb върху първоначалния растеж и развитие на растенията

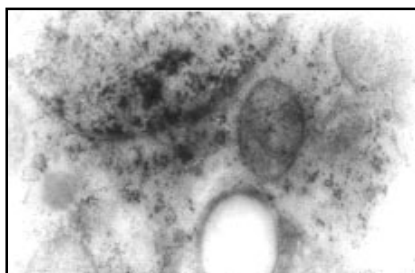
**Table 3.** Effect of Pb on initial growth and development of plants

Вариант Variants	Корен / Root				Стъбло / Stem			
	Дължина Length (cm)	Д (%) D (%)	Тегло Weight (g)	Д (%) D (%)	Висо- чина High (cm)	Д (%) D (%)	Тегло Weight (g)	Д (%) D (%)
К-ла Control	9.16		0.41		12.08		0.47	
Pb 1.5 mM	5.23	42.9	0.33	19.5	10.01	17.1	0.40	14.9
Pb 3.0 mM	3.28	64.2	0.25	39.0	7.44	38.4	0.38	16.1
Pb 4.5 mM	1.94	78.8	0.11	73.2	6.52	46.0	0.31	34.0

На таблца 3 е отразено влиянието на оловото върху първоначалния растеж и развитие на 14-дневни растения по показател депресия. Наблюдава се депресия в растежа и на корените, и на стъблата на растенията. Тя е по-изразена при корените (дължина и тегло) – от 42.9 до 78.8 % за дължината на корените и от 19.5 до 73.2 % за теглото им. При стъблото депресията е по-слабо изразена – от 17.1 до 46.0 % за височината и от 14.9 до 34.0 % за теглото на стъблата на растенията.

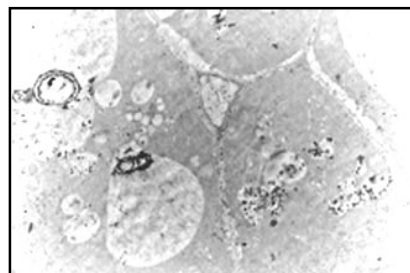
Ултраструктурата на клетките на коренчетата на нетретирани семена е с картина, характерна за меристемните клетки. Всички органели показват типична ултраструктура за развиващата се растителна клетка. Няма изменения или включения във вторичната клетъчна стена, както и в междуклетъчните пространства (фиг. 1).

При третиране с концентрация 0.75 mM PbCl<sub>2</sub>, оловото се отлага главно върху вторичната клетъчна стена във вид на аморфно-кристални плаки. Наблюдава се постепенно навлизане на метала в клетките чрез ивагинации на плазмалемата и натрупване в ендоплазматичният ретикулум и вакуолите. Няма натрупване на оловото в други органели и изменение в клетъчната ултраструктура (фиг. 2).



**Фиг.1.** Нетретирана меристемна клетка

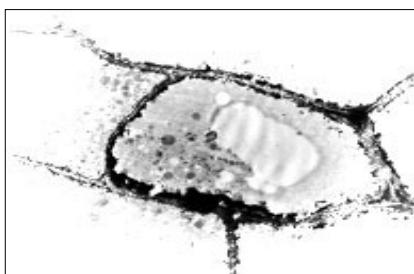
**Figure 1.** Untreated meristem cell



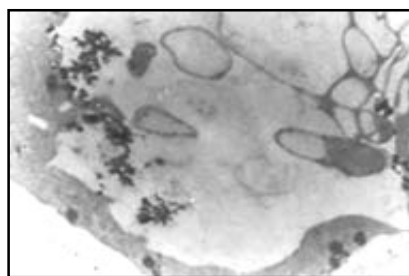
**Фиг. 2.** Клетка, третирана с 0,75 mM PbCl<sub>2</sub>

**Figure 2.** Cell, treated with 0,75 mM PbCl<sub>2</sub>

При третиране с концентрация 1.50 mM PbCl<sub>2</sub> настъпват съществени изменения в ултраструктурата на меристемата. Обособяват се две зони на локализация на оловото – външна и вътрешна. Между тях коренът изгражда няколкокоплойна преградна бариера, в чиито клетки и междуклетъчни пространства се натрупват големи количества оловни конгломерати (фиг. 3). Наличието на тази бариера предпазва зоната на нарастване от токсикация на външния агент. Това е своеобразен отговор на растението на увеличаващата се концентрация на оловото. Във външната зона се наблюдава засилване на проникването на метала в дълбочина, обхващащо постепенно структурата на цялата клетка. Металните плаки се наблюдават в целият вакуоларен апарат, ендоплазматичният ретикулум, в перинуклеарното пространство и в самото ядро. Наличната бариера предпазва зоната на нарастване, където се наблюдават изменения, характерни за предишната, по-ниска концентрация 0,75 mM PbCl<sub>2</sub> (фиг. 4).

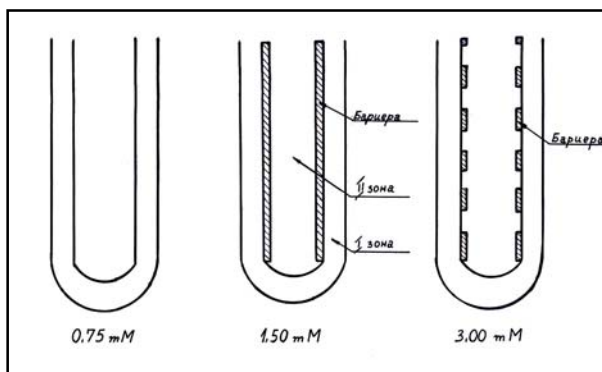


Фиг. 3. Клетка, третирана с 1,50 mM PbCl<sub>2</sub>  
Figure 3. Cell treated with 1,50 mM PbCl<sub>2</sub>



Фиг. 5. Клетка, третирана с 3,00 mM PbCl<sub>2</sub>  
Figure 5. Cell treated with 3,00 mM PbCl<sub>2</sub>

При най-високата доза на третиране 3.00 mM PbCl<sub>2</sub> се наблюдават ясноизразени дегенеративни процеси – частичен плазмолиз, автофагия и лизис, както и блокаж на ядрата в различни фази, с пикнотични изменения. Натрупването на оловото довежда до деструктивни изменения на клетъчните органели и загиването на клетките. Наличната бариера е силно разкъсана и вероятно не функционира (фиг. 5).



Фиг. 4. Схема за образуването на преграда бариера при 1,50 mM PbCl<sub>2</sub>  
Figure 4. Scheme of forming of blocking cell-layer barrier with 1,50 mM PbCl<sub>2</sub>

При *in vitro* културите се наблюдава лека депресия на калусния растеж при ниските концентрации на медните йони в диапазон 0.25-0.75 mM (табл. 4). С увеличаване на

концентрацията плавно спадат стойностите на теглото на калуса, като при концентрация от 5 mM се наблюдава два пъти намаляване на растежа. При най-високата изпитана концентрация 10 mM калусът е оводнен и неговото тегло се увеличава без да има растеж.

**Таблица 4.** Нарастване на *in vitro* култури от грах върху среда с различно съдържание на медни йони ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

**Table 4.** Growth of pea *in vitro* cultures on media with different concentrations of cuprum ions ( $\text{Cu}^{2+}$ ).

Концентрация на $\text{Cu}^{2+}$ в средата (mM) Concentration of $\text{Cu}^{2+}$ in the media (mM)	Средно тегло Weight					
	на калуса of the calli			на пъпките of the buds		
	(mg)	Индекс <sup>1</sup> Index <sup>1</sup>	% от К <sup>2</sup> % of C <sup>2</sup>	(mg)	Индекс <sup>1</sup> Index <sup>1</sup>	% от К <sup>2</sup> % of C <sup>2</sup>
0.0 K/C	106 ± 7	2.06	100	93.6 ± 3	1.87	100
0.25	93.0 ± 7	1.86	87.7	95.0 ± 4	1.9	101.5
0.50	91.0 ± 6	1.82	85.8	110 ± 8	2.2	117.2
0.75	93.2 ± 5	1.86	87.9	85.0 ± 7	1.7	91.0
1.0	88.2 ± 6	1.76	83.2	74.4 ± 7	1.5	79.5
5.0	64.7 ± 3	1.29	61.0	54.1 ± 4	1.08	57.8
10.0	94.4	1.88	89.0	38.0 ± 8	0.7	40.0

<sup>1</sup> Индекс на нарастване на теглото, Index of weight growth

<sup>2</sup> (K) Контрола, (C) Control

При органогенните култури отрицателният ефект е по отношение както на броя на пъпките, така и на растежа им. За разлика от калусните култури, тук се наблюдава стимулиране на растежа при най-ниските концентрации (до 0.5 mM), след което при по-високи концентрации се проявява супресорното действие на медните йони и спиране на растежа при 10 mM. За разлика от калуса при тази концентрация при органогенните култури се наблюдава загиване на по-ранен стадий. LD<sub>50</sub> за органогенните култури е близка до тази на калусните - 5 mM. Тази концентрация може да се приеме за сублетална (LD<sub>50</sub>), подходяща за провеждане на опити по селекция и създаване на тестове *in vitro*.

## ОБСЪЖДАНЕ

Особеностите на цитотоксичното действие на  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  са оценявани по измененията на митотичния индекс. Наблюдаваното в таблица 1 критично снижаване на значението му показва наличие на инхибиращ ефект върху клетъчното деление при *Pisum sativum* L. Подобен депресивен ефект е наблюдаван и при други култури (Довгалюк и др. 2001; Przymuski & Wozny 1985).

От данните в таблица 2 се наблюдава зависимост на честотата на хромозомните аберации от приложената концентрация на  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  – с нарастването на концентрацията необратимо се увеличава процента на аберациите в митотичните клетки. Наличието на аберации, свързани с повреда на хромозомите, от типа на фрагменти и мостове, характеризира кластогенното действие на  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Анеугенна активност (способността да се предизвикват нарушения свързани с повредата на митотичния апарат – изоставащите хромозоми) се наблюдава при третиране и с трите концентрации на  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ .

Получените данни за способността на  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  да предизвиква хромозомни нарушения в растителните клетки са в унисон с резултатите, получени от други автори (Довгалюк и др., 2001; Fiskesjц, 1988; Wierzbicka, 1988).

Най-чувствителният показател за токсичното въздействие на замърсителите на околната среда върху растенията се явява инхибирането на кореновото нарастване (Wierzbicka 1988; Wierzbicka 1994). Депресията при нарастването на корена е по-висока в сравнение с тази при стъблото при 14-дневни растения. (табл. 3).

Върху ултраструктурната локализация и действие на тежките метали в клетката се работи отдавна и на различни видове растения. Изследванията дават по-пълна картина на дисфункцията в клетките и изясняват протичащите процеси (Antosiewicz & Wierzbicka, 1999; Piechlak et al., 2002; Stahlberg & Cosgrove, 1996). Наблюдаваната първична реакция на клетките с натрупване на оловото на вторичната клетъчна стена и в междуклетъчните пространства се обяснява със своеобразен защитен механизъм, свързан с проникването на йони от външната среда. Понататъшното проникване и натрупване на  $Pb^{2+}$ , настъпващо чрез ивагинации на плазмалемата, както и наличието на  $Cl^-$  нарушава нормалният клетъчен метаболизъм – (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Hall, 2002). Биохимичният и физиологичен ефект на токсичността на тежкия метал е свързана с неговия вид, количествено натрупване и обща токсичност на средата. Състоянието на клетката, нейният сулфатен и фосфатен статус допринасят за транслокациите на метала в меристемата в дълбочина – (Winder & Bonin, 1993). Като реакция на стреса на постъпване на метала се изменя генната експресия и започва свръхпроизводство на „стрес-протеини“ – фитохелати - Cobbett & Goldsbrough, (2002), подобни по функция на металотионините в животинската клетка. Те представляват осмотичноактивни субстанции, необходими за химично свързване и изолиране на металните йони във вакуолите и пространството между плазмалемата и вторичната клетъчна стена – (Zeng, 1996). Това обяснява до голяма степен изграждането на преградната бариера при концентрация 1.50 mM  $PbCl_2$ . Образуването на фитохелатите се провокира особено при наличие на йони на тежки метали от типа  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  - (Piechlak et al., 2002; Zeng, 1996). Тези съединения са строго специфични както за даденият метал, така и за всеки растителен вид и са типичен отговор-адаптация при растенията.

Резултатите показват, че медните йони в концентрации по-високи от 5 mM силно потискат растежа и развитието на тъканите *in vitro*. При селекцията е препоръчително да се използват концентрации предизвикващи леталност 50-70% (летална доза  $LD_{50}$ ,  $LD_{70}$ ). Нашите данни показват че такава концентрация трябва да се определи в диапазона на 5-10 mM на медните йони.

## БЛАГОДАРНОСТ

Публикуването на материала бе възможно с подкрепата на Проект СС 1201 с ФНИ.

## ЛИТЕРАТУРА

- Довгалюк, А. И., Т. Б. Калиняк, Я. Б. Блюм, 2001.** Оценка фито- и цитотоксической активности соединений тяжелых металлов и алюминия с помощью корневой апикальной меристемы лука, Цитология и генетика, 35(1): 3-9.
- Довгалюк, А. И., Т. Б. Калиняк, Я. Б. Блюм, 2001.** Цитогенетические эффекты солей токсичных металлов в клетках апикальной меристемы корней проростков *Allium cepa L.*, Цитология и генетика, 35(2): 3-10.
- Antosiewicz, D. and M. Wierzbicka, 1999.** Localization of lead in *Allium cepa L.* cells by electron microscopy. Journal of Microscopy, v.195,(2), 139-146.
- Cobbett, Ch. and P. Goldsbrough, 2002.** Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant Biol., v.53, 159-182.
- Fiskesjц, G., 1988.** The Allium test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. Mutat. Res., 197(2): 243-260.

- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of experimental Botany, v. 53, (366), 1-11.
- Kosturkova, G., Angelov G., Rodeva R., Tchorbadjieva M., A. Mehandjiev, 2003. In Vitro modelling of biotic stress - higher resistance of pea cultures to *Phoma medicaginis* var. *pinodella* culture filtrates. Proceedings V Int. Symposium "BioProcesses", 186-189
- Kosturkova, G., R. Todorova, A. Mehandjiev, 2004. Development of *in vitro* tests to study soybean drought tolerance. in "Legumes for the benefit of agriculture nutrition and the environment" ed. AEP, June, Dijon, France, 301.
- Lazarova, N. and A. Mehandjiev, 2000. Ultrastructural investigation of lead toxicity in pea roots (*Pisum sativum* L.). Compt. Rendus Acad. Bul. Sci., v. 53, (12, 103-106).
- Piechalak, A., Tomaszewska B., Baralkiewicz D. and Malecka A. 2002. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. Phytochemistry, v.60, (2), 153-162.
- Przymusky, R., A. Wozny, 1985. The reactions of lupin roots on the presence of lead in the medium. Biochem. Physiol. Pflanzen, 180: 309-318.
- Stahlberg, R. and D.J. Cosgrove, 1996. Induction and ionic basis of slow wave potentials in seedlings of *Pisum sativum* L. Planta, v.200, 416-425.
- Weakley, B.S., 1972. A beginner's handbook in biological electron microscopy. Edinburg / London, 175-182.
- Wierzbicka, M., 1988. Mitotic disturbances induced by low doses of inorganic lead. Caryologia, 41(2): 143-160.
- Wierzbicka, M., 1994. Resumption of mitotic activity in *Allium cepa* L. root tips during treatment with lead salts. Environ. Exp. Bot., 34: 173-180.
- Winder, C. and T. Bonin, 1993. The genotoxicity of lead. Mutation research, v.285, 117-124.
- Zenk, M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. Gene, v.179, 21-30.