

УДК 581.43

ИЗМЕРЕНИЕ ДИНАМИКИ РОСТА КОРНЕЙ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АЛЛИУМ-ТЕСТА

Буданцев А.Ю.

ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН»,
Пушchino, e-mail: budantsev@mail.ru

Был разработан фотографический метод измерения динамики роста корней в непрерывном эксперименте с помощью Allium теста в экологическом мониторинге (наличие мутагенов) и определении активности цитостатиков. Была оценена точность метода. Было показано, что точность измерения корневого прироста роста составляет 10%. Оценка точности измерения является статистически значимой и протестирована на большом количестве экспериментальных данных в оценке динамики роста корней при нормальных условиях и под влиянием различных химических соединений. Были испытаны соли тяжелых металлов и цитостатики (в частности, метотрексат). Показано, что предложенный метод дает меньшую ошибку при определении динамики роста корней в опытах, связанных с применением в экологическом мониторинге и фармакологии, по сравнению с ранее описанными методами.

Ключевые слова: экологический мониторинг, аллиум-тест, динамика роста корней

MEASUREMENT OF THE DYNAMICS OF ROOT GROWTH BY THE ALLIUM NEST

Budantsev A.Y.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, e-mail: budantsev@mail.ru

Was developed photographic method for measuring the dynamics of root growth in the continuous experiment using Allium test in environmental monitoring (presence of mutagens) and determining the activity of cytotoxic drugs. Accuracy of the method was evaluated. It was shown that the accuracy of measurement of the root growth in growth is 10%. Evaluation of the accuracy of measurement is statistically significant and it is tested on a large number of experimental data in assessing the dynamics of root growth under normal conditions and under the influence of various chemical compounds. Were tested, and salts of heavy metals, cytotoxic agents (such as methotrexate). It is shown that the proposed method gives a lower error in determining the dynamics of root growth in the experiments involving the use of environmental monitoring and pharmacology, as compared to the previously described methods.

Keywords: ecological monitoring, Allium test, dynamics of root growth

Аллиум-тест широко используется в экологическом мониторинге (определение мутагенов, тяжелых металлов и других загрязнителей в объектах окружающей среды) и при анализе фармакологических соединений цитотоксического действия [4, 8–13].

На практике использование Аллиум-теста реализуется последовательно двумя приемами. Вначале измеряется динамика роста корней, что позволяет определить наличие у тестируемого соединения цитотоксической активности («да-нет»). Если показана такая активность, проводится цитогенетическая оценка митотического аппарата клеток апекса: общий митотический индекс, индексы, показывающие прохождение клеточного цикла («профазный индекс», «анафазный индекс» и др.) и различные аномалии митотического цикла клеток («липкость» хромосом, хромосомные мосты, микроядра, фрагментация хромосом и др.).

Динамика роста корней (обычно в течение 4–5 дней) определяется двумя методами:

1) измерением длины корней без их отделения от луковицы, что позволяет вести регистрацию роста корней в ходе всего опыта [9–11];

2) прямым измерением длины корней после их отделения от луковицы [9, 10, 13].

Первый метод проще, но возникают трудности в точности измерения длины корней. Второй подход более точный, но не позволяет проследить непрерывную динамику роста корней.

В данной работе предлагается простой фотографический способ измерения динамики роста корней в непрерывном хроническом опыте при использовании Аллиум-теста. В работе дана оценка точности предложенного метода.

Материал и методы исследования

Опыты поставлены на 30-ти луковицах первого года урожая – севок (*Allium cepa* L.) сорта Штутгартер ризен, осеннего урожая 2012 г. (Фирма Plantuitjes, Голландия). Перед опытами использовались стандартные процедуры активации луковиц (выдерживание при температуре + 10°C в течение 10 дней, затем содержание при комнатной температуре в темноте в проветриваемых коробках). Луковицы в штативе ежедневно фотографировались цифровым фотоаппаратом Canon A-350 (Япония). На фотографии каждой луковицы измерялась длина 5 наиболее развитых корней. После фотографирования, часть луковиц извлекалась из пробирок, корни отрезались

и фотографировались тем же фотоаппаратом. Изменение длины корней проводилось с использованием программы PhotoM (v.1.21, http://t_lambda.chat.ru). Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведены три серии опытов, показавшие идентичные результаты. Приведем результаты одного опыта. Вес, диаметр и высота луковиц были измерены в первый

день выращивания луковиц в пробирках (табл. 1).

Измерение длины выделенных корней показало большой разброс размеров корней. Например, все корни по длине на четвертый день роста (луковица № 6) можно условно разделить на три группы: активно растущие (длина 45,9–49,8 мм), средне растущие (длина 39,0–44,8 мм) и мелкие корни (длина 8,5–37,5 мм), рост которых сильно отстает от корней первой группы (табл. 2).

Таблица 1

Морфометрические параметры луковиц

Номер луковицы	Морфометрические параметры луковиц			
	Вес (г)	Диаметр (см)	Высота (см)	Количество корней
1	4,4	2,3	2,59	52 48 (3-й день) 53
2	5,0	2,5	2,2	
3	3,9	1,9	2,4	
4	5,1	2,3	2,4	40 47 (4-й день) 53
5	4,5	2,0	2,2	
6	3,9	1,9	2,3	
7	4,8	2,3	2,2	56 54 (5-й день) 42 40
8	5,2	2,2	2,1	
9	4,1	2,2	1,8	
10	5,2	2,0	2,3	

Таблица 2

Длина 53 корней луковицы № 6 (ранжированы по уменьшению длины)

№ п/п	Длина (мм)										
1	49,8	11	47,3	21	44,7	31	42	41	30,2	51	13,3
2	49,8	12	46,8	22	44,5	32	40,7	42	29,7	52	9,8
3	49,7	13	46,7	23	44,4	33	40,5	43	29,3	53	8,5
4	49,5	14	46,7	24	44,3	34	39,4	44	25,8		
5	49	15	46,5	25	44,2	35	39	45	25,6		
6	48,4	16	46,4	26	44,2	36	37,5	46	25		
7	47,7	17	46,4	27	44,1	37	37,2	47	20,6		
8	47,6	18	45,9	28	43,3	38	36,4	48	18,7		
9	47,4	19	44,8	29	43,3	39	34,4	49	17,3		
10	47,4	20	44,7	30	43,1	40	30,4	50	14		

Следует отметить, что группа «мелких» корней часто содержит сильно извилистые корни и находится по краям донца луковиц. В связи с таким распределением размера корней расчет средней длины корней и ошибки средней величины для всей совокупности корней не будет отражать истинных значений роста корней всей луковицы.

Анализ длины корней в пробирках штатива, после ежедневного фотографирования, был проведен, как отмечено выше, по

следующей методике: на фотографии каждой пробирки выбирались 5 самых длинных корней и измерялась их длина.

Для оценки точности прямого измерения длины корней на фотографиях целых луковиц мы использовали следующий подход. Из выделенных корней мы выбирали 10–15 наиболее длинных корней из группы наиболее интенсивно растущих и рассчитывали статистические параметры. Эти значения принимали как контрольные, относительно которых оценивалась длина корней,

измеренная у луковиц в штативе (5 наиболее длинных корней).

Результаты сравнительного измерения показали (табл. 3), что разница между изме-

рением длины корней в штативе и прямым измерением длины отрезанных корней не выходит на пределы 10%, даже при выборке 15 корней.

Таблица 3

Итоговая таблица сравнения корней (10 и 15 наиболее длинных) и измерение длины корней в ростовых пробирках (Ш). (M ± m)

Дни опыта	Номера луковиц (длина корней в мм)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1-й	7,3 ± 0,4	6,2 ± 0,3	8,9 ± 0,2	7,3 ± 0,6	7,6 ± 0,2	5,7 ± 0,2	6,4 ± 0,2	7,4 ± 0,2	6,9 ± 0,2	5,8 ± 0,3
2-й	20,3 ± 0,2	20,4 ± 0,2	24,0 ± 0,3	24,8 ± 0,9	24,6 ± 0,4	18,1 ± 0,5	21,8 ± 1,1	23,1 ± 0,7	21,9 ± 0,5	21,6 ± 0,5
3-й Ш*	32,4 ± 0,9	33,6 ± 0,4	32,9 ± 0,9	37,0 ± 0,3	37,5 ± 0,5	30,6 ± 0,2	35,9 ± 0,5	37,1 ± 0,8	31,1 ± 0,4	31,5 ± 0,8
К(10)**	32,9 ± 0,5	31,7 ± 0,4	33,2 ± 0,2							
%***	-1,5%	+6,0%	-1,0%							
К(15)	31,9 ± 0,5	30,9 ± 0,4	32,6 ± 0,3							
%	+1,6%	+8,7%	+0,9%							
4-й Ш				56,3 ± 0,3	54,5 ± 0,5	47,7 ± 0,5	54,4 ± 1,0	54,8 ± 1,2	49,1 ± 0,4	45,8 ± 0,7
К(10)				52,1 ± 0,3	54,1 ± 1,2	48,6 ± 0,3				
%				+8,1%	+0,7%	-1,9%				
К(15)				51,8 ± 0,2	52,8 ± 0,9	48,0 ± 0,3				
%				+8,7%	+3,2%	-0,7%				
5-й Ш							63,2 ± 0,7	65,8 ± 0,7	62,2 ± 0,7	54,5 ± 0,5
К(10)							65,7 ± 0,4	67,8 ± 0,6	62,2 ± 0,7	58,0 ± 0,6
%							-3,1%	-3,0%	0%	-6,0%
К(15)							65,0 ± 0,4	66,9 ± 0,5	61,2 ± 0,6	56,5 ± 0,7
%							-7,2%	-1,7%	+1,6%	-3,5%

Примечания: *Ш – измерение 5-ти корней по фотографиям штатива (непосредственно в ростовых сосудах, см. метод);

**К – прямое измерение выделенных корней, 10 и 15 наиболее длинных корней (см. метод);

***% – процент отличия измерений в Ш от прямого измерения (К(10) и К(15) взято за 100%).

Наиболее подробно методические вопросы, связанные с использованием Аллиум-теста, представлены в ряде статей, в которых, в частности, обсуждается вопрос о методах измерения длины корней [9–11, 13 и др.]. Обычно тестирование проводится в течение 4–5 дней и необходимо иметь простой и быстрый метод надежного измерения динамики роста корней. Как отмечалось выше, предлагаются два метода: прямое измерение длины корней в ходе опыта (позволяет измерять длину корней в динамике роста) или путем измерения длины отделенных от луковиц корней (не допускает исследовать рост корней в течение всего опыта).

Метод измерения длины корней, предложенный [9], показал, что измерение пакета корней при помощи линейки при временном вынимании луковиц из опытного сосуда дает ошибку измерения 14,3%.

Однако надо отметить, что метод измерения длины «пакета» корней при помощи линейки нельзя считать точным, учитывая большой разброс длины корней в «пакете». Предлагаемый нами метод измерения выборки из 5-ти наиболее длинных корней на фотографиях всех луковиц в процессе роста

корней сочетает в себе простоту, удобство, достаточную точность (в пределах 10%), что делает этот метод более эффективным, чем метод G. Fiskesjo.

Используя описанную методику измерения длины корней, мы провели ряд экспериментов по анализу влияния операций на луковицах, метотрексата и тяжелых металлов на рост корней, результаты которых описаны в ряде статей [1–3, 5–7].

Дополнительные материалы данной работы представлены на сайте: <http://www.cam.psn.ru>.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-08-00295.

Список литературы

1. Буданцев А.Ю. Биоиндикация. – Saarbrücken: Palmarium Academic Publ, 2012. – С. 137.
2. Буданцев А.Ю., Кутышенко В.П. Действие метотрексата на первичный рост корней Allium sera // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 11. – С. 833–836.
3. Молчанов М.В., Кутышенко В.П., Буданцев А.Ю., Иваницкий Г.Р. От фрагментов к морфогенезу: ЯМР-спектроскопия метаболитов в апексе корней лука // ДАН. – 2012. – Т. 442. – № 6. – С. 828–832.
4. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ.

Гигиенические критерии состояния окружающей среды. – Женева: ВОЗ. – 1989. – Вып. 51. – С. 212.

5. Budantsev A.Yu. The Allium test: Injection of test compounds into the bulb // Biotechnic and Histochemistry. – Vol.88. – № 6. – 2013a. – P. 323–328.

6. Budantsev A.Yu. The growth of roots and green leaves of *Allium cepa* L. after the removal of different parts of the bulb // American J. Plant Sciences. – 2013 б. – Vol. 4. – P. 972–975.

7. Budantsev A.Yu., Uversky V.N., Kuthischenko V.P. Analysis of the Metabolites in Apical Area of *Allium Cepa* Roots by High Resolution NMR Spectroscopy Method // Protein and Peptide Letter. – 2010. – Vol.17. – № 1. – P. 86–91.

8. Deysson G. Antimitotic substances. International Review of Cytology. – 1968. – Vol. 24. – P. 99–148.

9. Fiskesj G. The Allium-test as a standart in environmental monitoring // Hereditas. – 1985. – Vol. 102. – P. 99–112.

10. Fiskesjo G. The Allium-test. 43. In vivo toxicity testing protocols. In: Methods in molecular biology, Eds. O'Hare S., Atterwill C.K. Totowa N.J. – Copyr. Humana Press Inc., 1995. – P. 119–127.

11. Fiskesjo G. Allium test for screening chemical evaluation of cytological parameters // In: Plants for Environmental Studies, Eds. Wang, W., Gorsuch, J.W. and Hughes, J.S. – New York: CRC Lewis Publishers, 1997. – P. 307–333.

12. Truhaut R., Deysson G. Sur les proprietes animitiques des antifoloques. Recherches a l'aide du test Allium // Biochemical Pharmacology. – 1964. – Vol. 13. – P. 1197–1207.

13. Wierzbicka M., Antosiewicz D. Allium test – some questions // Acta Soc.Bot.Poloniae. – 1988. – Vol. 57. – № 2. – P. 201–215.

4. Manual of short-term tests for the detection of mutagenic and carcinogenic chemical substances. Hygienic criteria of environment. Geneva: HWO. 1989. issue 51. pp. 212.

5. Budantsev A.Yu. The Allium test: Injection of test compounds into the bulb // Biotechnic and Histochemistry. Vol. 88. no. 6. 2013a. pp. 323–328.

6. Budantsev A.Yu. The growth of roots and green leaves of *Allium cepa* L. after the removal of different parts of the bulb // American J. Plant Sciences. 2013 б. Vol. 4. pp. 972–975.

7. Budantsev A.Yu., Uversky V.N., Kuthischenko V.P. Analysis of the Metabolites in Apical Area of *Allium Cepa* Roots by High Resolution NMR Spectroscopy Method // Protein and Peptide Letter. 2010. Vol. 17. no. 1. pp. 86–91.

8. Deysson G. Antimitotic substances. International Review of Cytology. 1968. Vol. 24. pp. 99–148.

9. Fiskesj G. The *Allium*-test as a standart in environmental monitoring // Hereditas. 1985. Vol. 102. P. 99–112.

10. Fiskesjo G. The *Allium*-test. 43. In vivo toxicity testing protocols. In: Methods in molecular biology, Eds. O'Hare S., Atterwill C.K. Totowa N.J. Copyr. Humana Press Inc., 1995. pp. 119–127.

11. Fiskesjo G. Allium test for screening chemical evaluation of cytological parameters // In: Plants for Environmental Studies, Eds. Wang, W., Gorsuch, J.W. and Hughes, J.S. New York: CRC Lewis Publishers, 1997. pp. 307–333.

12. Truhaut R., Deysson G. Sur les proprietes animitiques des antifoloques. Recherches a l'aide du test Allium // Biochemical Pharmacology. 1964. Vol. 13. pp. 1197–1207.

13. Wierzbicka M., Antosiewicz D. *Allium* test some questions // Acta Soc.Bot.Poloniae. 1988. Vol. 57. no. 2. pp. 201–215.

References

1. Budantsev A.Yu., Bioindication. Saarbrucken: Palmarium Academic Publ., 2012. pp. 137.

2. Budantsev A.Yu., Kutysenko V.P. Effect of methotrexate on the primary growth of roots of *Allium cepa* // Fundamental Research. 2012. no. 11. pp. 833–836.

3. Molchanov M.V., Kutysenko V.P., Budantsev A.Yu., Ivanitsky G.R. From Fragments to Morphogenesis: NMR Spectroscopy of Metabolites in the Apex of the Roots of Onion // Doklady Biochemistry and Biophysics. Vol. 442. 2012. pp. 52–56.

Рецензенты:

Брусков В.И., д.х.н., профессор, зав. лабораторией изотопных исследований Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино;

Мирошников А.И., д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биофизики клетки РАН, г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 07.05.2014.