

Ekol. Zašt. Život. Sred.	Tom 8	Broj N ^o 1-2	str. p-p 41-46	Skopje 2002/03
Ekol. Zašt. Život. Sred.	Tom			Skopje

UDK: 504.73.054:546.3(497.7)
originalen nau-en trud

VLIJANJE NA TEŽKI METALI VRZCI TOGENETSKI OT STATUS NA *Plantago lanceolata* L.

Mari neta ATANASOVA, Ivko SEKOVSKI, Gordana DIMESKA i Milto MULEV

Institut za biologija, PMF, Gazi Babab, 1000 Skopje, Makedonija

I ZVOD

Atanasova M., Sekovski I., Dimeska G. i Mulev M. (2002/03). Vlijanje na teški metal i vrzci togenetski ot status na *Plantago lanceolata* L. Ekol. Zašt. Život. Sred. Tom 8, Br. 1-2, Skopje.

So cel da se ispita citogenetskoto vlijanje na teški metal i (Cu, Cd, Pb i Zn) vrzmi totski ot indeks, mitozata, mejozata i fertilitnost na polenot kaj *Plantago lanceolata*, kolektirani se semenski materijal i cvetni pupki od istoto rastenje od bliskata okolina (100m) na toplinica MHK „Zletovo“ Veles vo R. Makedonija.

Kako kontrolen materijal se smeta semenski ot materijal i cvetni te pupki od *P. lanceolata* kolektirani vo lokalitetot Gurište vo blizina na gradot Sveti Nikole.

Ispituvaweto na koncentracijata na ovie teški metal i vo povata, kako i voli stovite pokauva deka vo okolinata na toplinica „Zletovo“ tie se od 1.5 do 90 pati pogolmi otkolkuvo Gurište. Zaradi toa se oekuva e, a potoa i se potvrdi vlijanieto na ovie metal i vrzci togenetski ot status na ispituvanite rastenija.

Mitotski ot indeks kaj *P. lanceolata* znaitelno e namalen, a od citološki te promeni vo tekot na mitotski ot delben ciklus najzastapeni se: binuklearni kletki, mikronukleusi, citomikozija i dr.

Ispituvawata na mejotski ot delben ciklus pokauvaat golem procent na defektni kletki, što rezultira so namaluvawena fertilitnost na polenot i pojava na defektni polenovizrna.

Ključni zborovi: *Plantago lanceolata*, teški metal i, mitozata, mejozata, mitotski indeks, fertilitnost na polen

ABSTRACT

Atanasova, M., Sekovski I., Dimeska G. & Mulev M. (2002/03). The influence of heavy metals to cytogenetic status of *Plantago lanceolata* L. Ekol. Zašt. Život. Sred. Vol. 8, No. 1-2, Skopje.

In purpose to investigate the influence of heavy metals (Cu, Cd, Pb and Zn) to mitotic index, mitosis, meiosis and fertility of pollen, seed material and flower buds has been collected from *Plantago lanceolata*, from the near area (100m) of melting factory MHK „Zletovo“ Veles R. Macedonia.

Seed material and flower buds of the same plant from Gurište near the town Sveti Nikole has been considered as control material.

Investigation of concentration of this heavy metals in the soil as well as in leaves of chosen plant showed 1.5 - 90 times larger amount in the area of melting factory „Zletovo“ Veles, compared to those in Gurište. That is why we expected and than confirmed the influence of those metals to cytogenetic status of investigated plant.

Mitotic index of *P. lanceolata* has been significantly decreased, and the most frequently changes in mitotic cycle are: binuclear cells, micronuclei, cytomixis.

The investigation of meiotic cycle shown high number of abnormal cells, which results in decrease of pollen fertility, and abnormal pollen.

Key words: *Plantago lanceolata*, heavy metals, mitosis, meiosis, mitotic index, pollen fertility

Voved

Vo posl edni te dekad i zagaduvaweto na ` i votnata sredi na so te{ ki metal i se zgo-lemuva drasti ~no. Se znae deka odredeni te{ ki metal i predi zvi kuvaat DNA o{ tetuvawa i razli ~ni hromozomski abnormalnosti, a ni vni te kancerogeni ef ekti na ` i votni te i ~ovekot najverojatno se povrzani so ni vni te mutageni akti vnosti .

Rasteni jata mo ` at da se podel at vo dve grupi spored osetl i vosta kon zagaduvaweto a) senzi ti vni vi dovi so razli ~en stepen na senzi ti vnost kon ef ekti te na zagaduvaweto i b) tolerantni vidovi koi ostanuvaat ` i vi i navi dum nepovredeni vo ni vnata pri rodna sredi na (Malallah et al., 1995).

Vo li teraturata kade e pri ka ` ana anal izata na hromozomi te se upotrebuva mitotski ot indeks kako pokazatel za mitotskata akti vnost. Mitotski ot indeks se menuva (obi ~no se namal uva) pri del uvawe na bil o koj agens voop{ to, { to zna~i deka toje pri maren odgovor na organi zmot (rastitelen ili ` i votni ski) na izmeneti te ` i votni uslovi (Drušković, 1984).

Materijal i metodi

I spituvana e sodr ` i nata na te{ ki te metal i (Cu, Cd, Pb i Zn) vo pri meroci od po~va i vo li stovi na rasteni ja od *Plantago lanceolata* L. vo neposredna bli zi na (100 m) na f abrikata za proi zvodstvo na ol ovo i cink vo Vel es, a za sporedba isti te anal izi se napraveni i za pri meroci od po~va i listovi na isti te rasteni ja od lokal ite tot \uri { te, koj se nao|a vo bli zi na na gradot Sveti Ni kole, na nadmorska vi si na od 900 m, predel koj se smeta za relati vno ~i sta ` i votna sredi na.

Za ci tol o{ ka anal iza, za utvrduvawe na mitotski ot indeks i otkri vawe na eventual ni anomal i i pri mitotski ot del ben ci klus kori steno e meri stemsko tki vo od

vrven korenov meri stem od anal izi rani te rasteni ja.

Materijal ot e obraboten spored ci tol o{ kata tehni ka na Tjio & Levan (1950), kako i standard „squash“ metodata po Battaglia (1955). Materijal ot e tretiran so ci tostatik, 8-hydroxyquinoline (0,002 M), za vreme od 12 - 24 ~asa, na sobna temperatura. Korenovi te vrsvi se f iksi rani vo f iksati v po Kl ark (al kohol -ocetna ki seli na so odnos 3 : 1) i po 24 - 48 ~asa, koren~i wata se pref rleni vo 75 % etil al kohol vo koj se odr ` uvani podolg peri od, na temperatura od 4° C se do upotrebata.

Obojuvaweto na hromozomi te e napraveno so Schiff - ov reagens (leuco-basic fuchsin), spored metodot na Darlington & La Cour (1962), i so hematoxylin po Gomori spored metodot na Konstantinov i sor. (1985).

Za sekoe rasteni e posebno presmetan e mitotski ot indeks - MI ~i i vrednosti se izrazeni vo %, a se bazi raat na merewa napraveni na prose~no 3000 kl etki od tri razli ~ni preparati . Toj go izrazuva % na kl etki vo del ba (od prof aza do tel of aza) vo odnos na vkupni ot broj meri stemski kl etki .

Od pri vremeni te preparati se izrabotuvani i trajni preparati so upotreba na te~en CO₂, po metodot na Bowen (1956). Po kratkotrajno smrznuvawe, preparati te se i spirani so apsoluten al kohol i se vkl opuvani vo Euparal.

Za anal izata na hromozomi te vo me- jotski ot del ben ci klus, kori steni se ml adi i sve ` i cvetni pupki, ~i i anteri se so odredena gol emi na i vo odredena f aza od del bata, se f iksi rani vo aceto-al kohol en (1 : 3) f iksati v po Kl ark, i vo Karnya f iksati v - al kohol , hl orof orm i ledena ocetna ki seli na vo odnos 6 : 3 : 1. Boeweto na anteri te e napraveno vo 2% aceto-orcein ili aceto-karmi n. Od izol irani te i oboeni anteri ,odnosno mati ~ni pol enovi kl et-

ki po „squash“ metodata na Darlington & La Cour (1962), napraveni se preparati za analiza na tekot na mejotski ot del ben ciklus.

Preveduvaweto na privremeni tevo tajni preparati e na ista na~in kako i za mi totski te hromozomi.

Od pogol emi te cvetni pupki napraveni se preparati za presmetuvawe na % na ferti lnost so Jod - Gliceri nska metoda (Petrović & Vućenović 1992). Fertili nosta e odredena vrz baza na analiza ta na pribli`no 3000 pol enovi zrna po rasteni e (po 1000 pol enovi zrna na 1 preparat), a e izrazena vo odnos na 100.

Trajni te preparati koristen i vo analiza ta na dvata del ben i ciklusi , se ~uvaat vo zbir kata na preparati vo laboratorija za geneti ka, ci tologija, anatomija i morf ologija na rasteni jata pri Botani ~ki ot zavod so botani ~kata gradi na na Insti tutot za Bi ologija, pri Pri rodno-matemati ~ki ot f akul tet vo Skopje.

Za sekoja analiza zira grupa na rasteni ja, određen broj na mi totski i mejotski kletki se mikrof otograf irani so Reichert - f otomi kroskop.

Rezul tati i di skusi ja

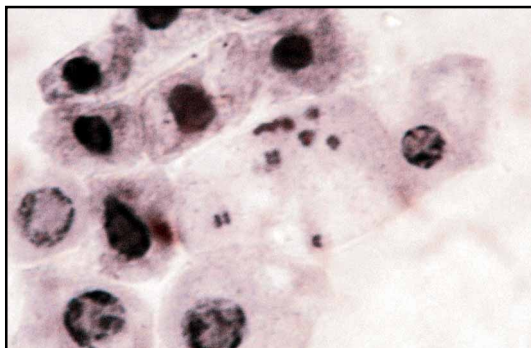
Vo okoli nata na topil ni cata MHK „Zletovo“ Vel es postojat dva razli ~ni na~ina na vl ijani e na { tetni te materi i i toa di rektno od vozduhot i i ndi rektno preku po~vata. Se raboti za pove}e agensi koi mo`at da i maat genotoksi ~en efekt na rasteni jata i kaj koi mo`e pokraj di rektni ot efekt da nastapi i akumul ati ven efekt.

Merena e koncentracija ta na neko i od

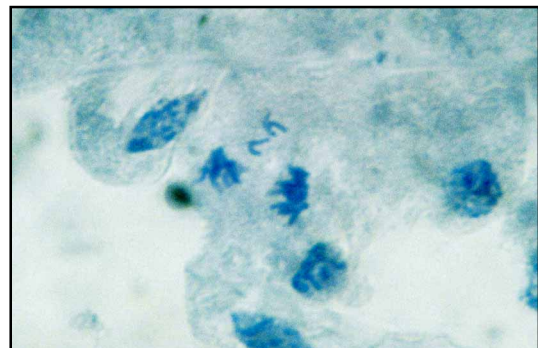
te{ ki te metal i (Pb, Zn, Cd i Cu) vo listovi od *P. lanceolata* od \uri { te kako kontrol en materijal i Vel es. Pri toa e utvrđeno deka koncentracija ta na Pb e pogol ema od 2 do 23 pati , koncentracija ta na Zn e pogol ema od 21 do 24 pati , koncentracija ta na Cd e pogol ema od 10 do 90 pati , a ta na Cu e pogol ema samo od 1.5 do 2.3 pati vo listovi te od Vel es za razli ka od \uri { te.

Pri analiza ta na mi totski ot i ndeks vo meri stems koto tki vo na korenovi te vrvovi na *P. lanceolata* od Vel es zabele`ano e si gni f i kantno namal uvawe vo sporedba so isti te od \uri { te. Si gni f i kantno se namal uva i brojot na kletki koi se nao|aat vo prof aza, metaf aza i tel of aza (Tab. 1). Namal uvawe na mi totski ot i ndeks zabele`al e Šopova i sor. (1983) pri tretman na koren~i wa od *Allium sativum* L. so ekstrakt od tutunovi li sja i Šopova i sor. (1985) pri tretman na koreni wa od *Allium sativum* so razli ~ni koncentraci i na ni koti n.

Ci tolo{ kata analiza poka`uva prisustvo na kletki so promeni . I ako ni vnoto prisustvo ne e si gni f i kantno, uka`uva kakov ti p promeni nosi akumul ati vnoto dejstvo na te{ ki te metal i koi se nao|aat vo prisustvo na ova rasteni e. Pri sutni se bi nukl earni kletki , kletki so mi kronukl eusi , ci tomi ksi i , a poretko C-mi toza koja e rezul tat na nedostatok na del beno vreteno (Sl. 1), pojava na lagardi vo anaf aza { to e rezul tat na nevrzuvawe na cel i hromozomi za del beno vreteno (Sl. 2), degradi rawe na jadrata i pojava na kletki so pove}e mi kronukl eusi . Lagardi zabele`al i Amer (1965) vo anaf azni kletki na *Allium cepa* tretirana so N-methyl-1-naphthyl



Sl. 1. C-mi toza
Fig. 1. C-myotosis



Sl. 2. Anaf aza so 2 lagardi
Fig. 2. Anaphase with 2 lagards

Tab. 1. Mitotski indeks i frekvenci na kl etki so promeni kaj *Plantago lanceolata* L. od Gjuriste i Veles

Tab. 1. Mitotic index and frequency of changes in cells in *Plantago lanceolata* L. from Guriste and Veles

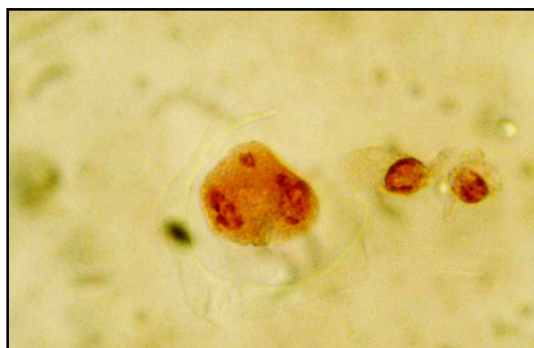
<i>Plantago lanceolata</i> L.	Locality	1	2	3	n	X	SD	ESD	t-test
Interfaza Interphase	Gjuriste	93.92	94.36	92.82	3	93.7	0.7932213	0.4579665	0.0019758
	Veles	97.91	97.97	97.03	3	97.636667	0.5262446	0.3039435	
Profaza Prophase	Gjuriste	3.6	2.27	3.63	3	3.1666667	0.776681	0.448417	0.0052875
	Veles	1.04	0.26	1.15	3	0.8166667	0.4852147	0.2801389	
Metafaza Metaphase	Gjuriste	1.15	1.57	1.6	3	1.44	0.2515949	0.1452584	0.0081962
	Veles	0.08	0.42	0.76	3	0.42	0.34	0.1962991	
Anafaza Anaphase	Gjuriste	0.2	0.64	0.68	3	0.5066667	0.2663331	0.1537675	0.1039995
	Veles	0	0	0.38	3	0.1266667	0.2193931	0.1266667	
Telofaza Telophase	Gjuriste	1.22	1.16	1.27	3	1.2166667	0.0550757	0.031798	0.0117524
	Veles	0.24	0	0.48	3	0.24	0.24	0.1385641	
Kl etki so promeni Cells with changes	Gjuriste	0	0	0	3	0	0	0	0.1536827
	Veles	0.72	1.35	0.19	3	0.7533333	0.5807179	0.3352777	
Binuklearni kl etki Binuclear cells	Gjuriste	0	0	0	3	0	0	0	0.3301477
	Veles	0.56	0.1	0	3	0.22	0.2986637	0.1724336	
Mikronukleusi Micronuclei	Gjuriste	0	0	0	3	0	0	0	0.1998911
	Veles	0.08	0.57	0.19	3	0.28	0.2570992	0.1484363	
Citomiksija Cytomixis	Gjuriste	0	0	0	3	0	0	0	0.3535125
	Veles	0.08	0.62	0	3	0.2333333	0.3372437	0.1947078	
Interfazna most Interphase bridge	Gjuriste	0	0	0	3	0	0	0	0.4226497
	Veles	0	0.05	0	3	0.0166667	0.0288675	0.0166667	
Mitotski indeks MI Mitotic index (MI)	Gjuriste	6.18	8.19	7.18	3	7.1833333	1.0050041	0.5802394	0.0290418
	Veles	1.36	0.68	2.77	3	1.6033333	1.0660363	0.6154763	

carbamate „Sevin“.

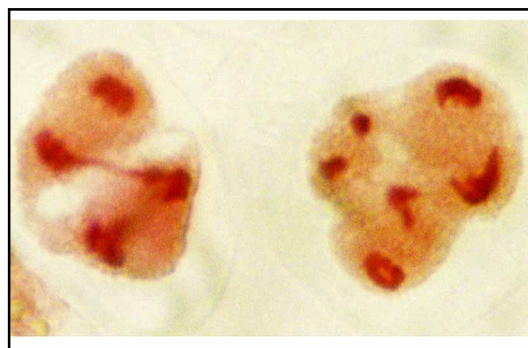
Pri analizi na mikrosporogenezata voo~eni se brojni otstupuvawa od regularni ot tek na del bata. Vo profaza I od mejoza ne mo`at da se zabel e`at neregularnosti zatoa {to hromozomi te se mnogu mali. Prvite nepravilnosti vo del bata se zabel e`uvaat vo anafaza I koga se pojavuvaat anafazni mostovi i zaostanati celi hromozomi (lagardi). Vo telofaza I se prisutni mikronukleusi (Sl. 3), koi se formirani ili od lagardite ili od frag-

menti te koi se formiraat pri kinewetona anafazni te mostovi. Pri suten e hromatinski most pome|u dve kl etki vo telofaza I {to e rezultat na nepravilnost vo del bata u{te vo predmejotskata mitoza.

Vo tekot na anafaza II, zabel e`ani se sprotno orientirani anafazni mostovi a i razli~na orientiranost na grupi hromozomi vo tekot na istata pri {to vo tekot na telofaza II se dobi vaat 5 ili 6 namesto 4 jadra (Sl. 4). Vo telofaza II zabel e`ani se i mnogu mali mikronukleusi.



Sl. 3. Mikronukleus vo telofaza I
Fig. 3. Micronucleus in telophase I



Sl. 4. Defektni dve kl etki
Fig. 4. Two abnormal cells



Sl. 5. Ci topl azmatski most vo anaf aza II

Fig. 5. Cytoplasmatic bridge in anaphase II

Tab. 2. Ferti l nost na pol en i f rekveni i na def ektni pol enovi zrna kaj *Plantago lanceolata* L. od \uri { te i Veles

Tab. 2. Pollen fertility and frekvency of abnormal pollen in *Plantago lanceolata* L. from Guriste and Veles

<i>Plantago lanceolata</i> L.	Locality	1	2	3	n	X	SD	ESD	t-test
Ferti l ni normal ni Fertile normal	Gjuri{te	93.01	90.15	85.02	3	89.393333	4.0483865	2.337337	0.0005294
	Veles	9.43	6.2	6.9	3	7.51	1.6992057	0.9810369	
Ferti l ni gol emi Fertile large	Gjuri{te	0.42	0.17	1.06	3	0.55	0.4590207	0.2650157	0.678424
	Veles	1.13	1.38	0.09	3	0.8666667	0.6841296	0.3949824	
Ferti l ni mal i Fertile small	Gjuri{te	0.08	0.17	1.7	3	0.65	0.9104395	0.5256425	0.3824693
	Veles	3.85	3.27	0.27	3	2.4633333	1.9214925	1.1093742	
Ferti l ni izdol `eni Fertile elongated	Gjuri{te	0	0.34	0.32	3	0.22	0.1907878	0.1101514	0.9757214
	Veles	0.38	0.17	0.09	3	0.2133333	0.1497776	0.0864741	
Steri l ni normal ni Sterile normal	Gjuri{te	5.47	8.57	9.56	3	7.8666667	2.1337838	1.2319407	0.0002333
	Veles	83.55	87.78	91.73	3	87.686667	4.0907986	2.3618237	
Steri l ni mal i Sterile small	Gjuri{te	0.93	0.51	2.34	3	1.26	0.9585927	0.5534438	0.6433944
	Veles	1.66	0.2	0.91	3	0.9233333	0.7300913	0.4215184	
Steri l ni gol emi Sterile large	Gjuri{te	0.08	0.08	0	3	0.0533333	0.046188	0.0266667	0.1835034
	Veles	0	0	0	3	0	0	0	
Vkupno def ekti Total abnormalities	Gjuri{te	6.99	9.85	14.98	3	10.606667	4.0483865	2.337337	0.0005294
	Veles	90.57	93.8	93.1	3	92.49	1.6992057	0.9810369	
Ferti l nost Fertility	Gjuri{te	93.52	90.83	88.1	3	90.816667	2.7100246	1.5646334	5.304E-05
	Veles	14.79	11.01	7.36	3	11.053333	3.7151895	2.1449657	

I vo tekot na prvata i vo tekot na vto-rata mejotska del ba se pojavuvaat ci topl azmatski mostovi , rezul tat na nepravil-na ci toki neza, a vo neкои kletki od tel o-f aza II taa potpol no otsustvuva (Sl. 5)

Neregul arnosti te vo tekot na me-jotski ot del ben ci kl us na krajot rezul ti-raat so signi f i kantno vi sok procent na steri l ni pol enovi zrna (Tab 2), a neкои od ferti l ni te pol enovi zrna se mnogu pogol emi ili pak mnogu pomal i od normal ni te.

Zakl u-ok

Od dosega{ ni te i stra` uvawa mo` eme da zakl u-i me deka pod vl ijani e na vi soki koncentracii na te{ ki metal i, kako vo

po~vata taka i vo samoto rasteni e, nastanu-vaat promeni vo somatski te kl etki kako i vo kl etki te koi se nao|aat vo mejotska del -ba.

Ci tol o{ ki te promeni vo somatskoto tki vo se mani f esti raat prvo so signi f i -kantno namal uvawe na mi totski ot i ndeks, a se zabel e` ani i bi nuklearn i kletki , kletki so mi kronukl eusi , ci tomi ksi i , a poretko se pojavuva C-mi toza.

Pri anal izata na mejotski ot del ben ci kl us konstati rani se brojni neregul arnosti { to e o~ekuvano zatoa { to kl etki te vo ovoj ci kl us se mnogu poosetl i vi na vl i-jani eto na te{ ki te metal i otkol ku so-matskoto tki vo. Def ekti te se pri sutni vo

tel of aza I i vo si te f azi od vtorata me-
jotska del ba, a toa rezul ti ra so vi sok pro-
cent na steril ni pol enovi zrna. Fertil-
ni te pol enovi zrna mo` at da i maat i zmene-
ta morf ol o gi ja a naj~esto se pri sutni po-
golemi ili pomali od normal ni te.

Referenci

Amer, S. (1965). Cytological Effects of Pesticides
I. Mitotic effects of N-methyl-1-naphthyl car-
bamate „Sevin“. Cytologia 30 (2): 175-181
Drušković, B. (1984). Uticaj zagadjenja sredine na
genetske promene u biljnim populacijama.

Doktorska disertacija, Novi Sad.

Malallah, G., Afzal, M., Gulshan, S., Abraham, D.,
Kurian, M. & Dhani, S.I., (1996). *Vicia faba*
as bioindicator of oil pollution. Environmen-
tal Pollution 92 (2): 213-217

Šopova, M., Sekovski, Ž. & Jovanovska, M.
(1983). Cytological effects of tobacco leaf ex-
tract on root tip cells of *Allium sativum* L. -
Acta Biol. Med. Exp. 8: 49-55.

Šopova, M., Sekovski, Ž. & Jovanovska, M.
(1985). Cytological effects of nicotine on root
tip cells of *Allium sativum* L. - Acta Biol. Med.
Exp. 10: 41-47.

THE INFLUENCE OF HEAVY METALS TO CYTOGENETIC STATUS OF *Plantago lanceolata* L.

Marinela ATANASOVA, Živko SEKOVSKI, Gordana DIMESKA & Milto MULEV

Summary

Mitotic index, mitosis, meiosis and fertility of pollen has been investigated from seed material and flower buds collected from *Plantago lanceolata* from Gurište near the town Sveti Nikole (control material) and from the near area (100m) of melting factory MHK „Zletovo“ Veles R. Macedonia.

Investigation of concentration of this heavy metals in the soil as well as in leaves of chosen plant shown 1.5-90 times larger amount in the area of melting factory „Zletovo“ Veles, compared to those in Gurište. Mitotic index of *P. lanceolata* has been significantly decreased, and the most frequently changes in mitotic cycle are: binuclear cells, micronuclei, cytomixis.

The investigation of meiotic cycle shown high number of abnormal cells, such as changes in anaphase I (lagards, bridges), telophase I (micronuclei) and all phases from second meiotic cycle, such as oposite orientated hromatin bridges in anaphase II, micronuclei, cytoplasmatic bridges (abnormal cytokinesis) etc. This changes result in decrease of pollen fertility, and abnormal pollen.