

УДК 574:575:631

Т.В. Мариненко, інж., І.А. Козерецька, канд. біол. наук,
І.М. Топчій, С.Г. Корсун, канд. сільск.-госп. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ ОПОСЕРЕДКОВАНОГО ВПЛИВУ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ГЕНЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Досліджено вплив важких металів на частоту летальних мутацій і частоту рекомбінації в статевій хромосомі *Drosophila melanogaster* в умовах агросистеми. Установлено, що підвищення вмісту важких металів у ґрунті впливає на генетичну активність водних екстрактів і не впливає на генетичну активність зерна, вирощеного в умовах забруднення.

It was investigated the heavy metals influence on frequency of lethal mutations and recombination processes in X chromosome of *Drosophila melanogaster* in agricultural system framework. We have established the influence of the increasing salt concentration on water extracts genetic activity. No influence was observed on genetic activity of seeds, growing in environmental pollution.

Вступ. Забруднення навколишнього середовища – одна з важливих проблем сьогодення. Серед великої кількості речовин, які є факторами забруднення, особливе місце посідають важкі метали, це пов'язано з потенційною небезпечністю більшості з них. У навколишнє середовище важкі метали потрапляють у вигляді твердих часток, солей або аерозолів. Осідаючи, вони, головним чином, депонуються в поверхневих шарах ґрунту. Надлишок політантив у ґрунті призводить до підвищення їхньої концентрації в природних водах. Важливим компонентом будь-якої екосистеми є рослини, для яких ґрунтові води – основний шлях мінерального живлення. Рослини, у свою чергу, виконують роль проміжної ланки в трофічному ланцюгу ґрунт – рослина – тварина (людина).

Наведені в різних літературних джерелах гранично допустимі кількості (ГДК) важких металів у ґрунті та сільськогосподарській продукції досить суперечливі й недостатньо аргументовані. Отже, існує необхідність проведення детального вивчення стану окремих компонентів екосистеми, які зазнають впливу політантив, і визначення характеру міграції їх у трофічному ланцюгу, починаючи з ґрунту. Одним із факторів, який безпосередньо слід враховувати при вивченні дії того чи іншого чинника на біологічні об'єкти, є його генетична активність. В основі спадкових змін лежать механізми, що забезпечують усьому живому дві універсальні його властивості: спадковість і мінливість. При величезному різноманітті форм живої матерії на Землі, багатьом молекулярним процесам притаманний консерватизм. Класичним генетичним об'єктом і визнаною у світі тест-системою є *Drosophila melanogaster*. На цьому тест-об'єкті можна *in vivo* проаналізувати можливість індукції генних мутацій, делецій і майже всіх можливих типів хромосомних перебудов як у гонадах, так і в соматичних тканинах [1].

Роботи з вивчення дії важких металів на генетичні процеси ведуться вже досить давно. Відомо, що розчини солей свинцю та кадмію викликають порушення процесів реплікації, зменшують точність копіювання ДНК, а розчин хлориду цинку спричиняє зсув рамки читування [2]. Але в досліді *in vivo* мутагенну активність свинцю та кадмію вдавалось зафіксувати лише за дії в комплексі з іншими шкідливими факторами, унаслідок підсилення дії інших мутагенів або утворення мутагенних комплексів. Тому на даний час домінуючою є думка про їхню опосередковану мутагенну дію. [3–7].

Метою роботи було дослідити опосередкований вплив важких металів на генетичні процеси в умовах агроценозу, використовуючи класичний тест-об'єкт *Drosophila melanogaster*.

Об'єкт і матеріали досліджень. У нашій роботі як фактор впливу на тест-систему були використані водні екстракти ґрунтів, що протягом двох років перебували під впливом забруднення певними дозами свинцю (до-

слід проводили в модельних лабораторних умовах), і зерно сої, ячменю та пшениці, вирощене на ділянках з різним рівнем забруднення свинцем, кадмієм і цинком. Польові дослідження було проведено на території дослідного господарства "Чабани" Інституту землеробства УААН. Ґрунт дослідної ділянки та використаний у лабораторних умовах – сірий лісовий крупнопилувато-легкосуглинковий. Штучне забруднення ґрунтів здійснювалось за рахунок внесення важких металів у формі нітратів. Вміст політантив у досліджуваних зразках визначали методом атомної абсорбції [8].

Аналіз впливу на геном дрозофіли здійснювали за допомогою загальноприйнятих у генетиці підходів [9]. Мух утримували при температурі 25 °С у склянках об'ємом 50 мл [10]. Водні екстракти та гомогенізовані зерна вносились до поживного середовища. У контрольному варіанті були використані вода з водопровідної мережі Голосіївського району м. Києва та манна крупа, придбана в торгівельній мережі.

Були використані два тести: тест на частоту летальних мутацій і тест на частоту рекомбінації в статевій хромосомі *Drosophila melanogaster*. Перший мав продемонструвати мутагенність досліджуваного фактора, а другий – його вплив на адаптаційну здатність організму.

У тесті на зчепленні з X хромосомою летальні мутації були використані дві лінії *Drosophila melanogaster*: лінія дикого типу (Canton S) і лінія C(1)DX зі зчепленими X хромосомами, яка маркована мутацією *yellow* (y, 1–0,0) [1]. Дії досліджуваного фактора піддавали самців дикого типу, які розвивались на середовищі, до складу якого було введено або екстракт ґрунту, або зерно досліджуваних сільськогосподарських культур. Оброблених самців переносили до стандартного поживного середовища й схрещували з віргінними самками лінії C(1)DX. Аналіз потомства проводили в першому поколінні. Статистичну обробку даних тесту проводили за допомогою методу χ^2 [11].

У тесті на частоту рекомбінаційних подій у статевій хромосомі *Drosophila melanogaster* використовували лінію дикого типу Canton S і лінію *wct*, що маркована рецесивними мутаціями *white* (w, 1–1,5) і *cut* (ct, 1–20). Самців дикого типу схрещували з віргінними самками лінії *wct* і протягом одного покоління утримували на поживному середовищі, до складу якого було введено або екстракт ґрунту, або зерно досліджуваних сільськогосподарських культур. Нашадків першого покоління пересаджували на стандартне середовище. Підрахунок частоти кросинговеру проводили в другому поколінні. У кожному варіанті досліді було проаналізовано понад 1500 особин. Похибку досліді обчислювали за формулою

$$\pm \sqrt{\frac{k\% \cdot (100 - k\%)}{N}},$$

де $k\%$ – коефіцієнт кросинговеру, N – загальна кількість особин [10].

Результати та їх обговорення. Як правило, на тест-об'єкт впливають безпосередньо конкретним фактором, дію якого вивчають, але в природних умовах живі організми перебувають під впливом цілого комплексу факторів. Ураховуючи, що свинець і кадмій можуть підсилювати дію інших мутагенних факторів, дослідження впливу цих металів необхідно проводити з максимальним наближенням до умов навколишнього середовища. Особливо важливо це в агросистемах в умовах усе зростаючої інтенсифікації сільського господарства. На акумулятивну здатність рослин може впливати багато різних факторів, зокрема індивідуальні особливості видів [12]. Саме тому в роботі було використано декілька сільськогосподарських культур.

За результатами спектрофотометричного аналізу встановлено:

- ♦ для всіх варіантів проаналізованих культур вміст важких металів у зерні перевищував гранично допустимі кількості, навіть при вирощуванні на ґрунті з природним рівнем забруднення;

- ♦ для всіх проаналізованих культур спостерігалась лінійна залежність вмісту важких металів в зерні та в ґрунті;

- ♦ культури відрізнялись за акумулятивною здатністю, найвищі кількості свинцю були зафіксовані в зерні сої;

- ♦ визначення вмісту свинцю у водорозчинних екстрактах ґрунту обмежувалось роздільною здатністю приладу (дослід проводили з точністю до 0,01). Для порівняння було проведено аналіз кислоторозчинної фракції ґрунту на вміст свинцю. Згідно з цим дослідом підвищення свинцю в ґрунті супроводжувалось збільшенням його кислоторозчинних форм.

Тест на зчеплені зі статтю летальні мутації у *Drosophila melanogaster*. Тест на зчеплені з X хромосою летальні мутації вважається найбільш чутливим і надійним у дослідженнях на дрозофілі й дозволяє виявити хімічні сполуки, які здатні індукувати спадкові генетичні порушення різної природи: точкові мутації, делеції, різні перебудови. У лінії C(1)DX кількість самців перевищує кількість самок з відхиленням від звичайного розподілу 1:1 і відповідає співвідношенню 3:2.

Таблиця 1. Результати тестів на частоту летальних мутацій і частоту рекомбінації в статевій хромосомі *Drosophila melanogaster*

Варіант досліджу	Насичення ґрунту важкими металами поза фоном*, мг/кг ґрунту	Коефіцієнт рекомбінації, %	Частота летальних мутацій
контроль			
1	–	18,5 ± 1,9	
Водні екстракти ґрунтів			
2	Pb ₀	21,84 ± 2,2	На рівні контролю
3	Pb ₅	18,66 ± 1,9	Вища за контроль
4	Pb ₂₀	18,59 ± 1,9	– " –
5	Pb ₅₀	23,06 ± 2,3	–
6	Pb ₁₀₀	16,78 ± 1,7	–
7	Pb ₂₀₀	11,84 ± 1,2	Вища за контроль
8	Pb ₅₀₀	20,28 ± 2,8	– " –
Зерно пшениці, вирощене на природному та геоаномальних ґрунтових фонах			
9	Pb ₀ Zn ₀ Cd ₀	14,96 ± 1,8	На рівні контролю
10	Pb ₁₀₀ Zn ₅₀ Cd ₂	20,09 ± 2,06	– " –
11	Pb ₁₀₀₀ Zn ₅₀₀ Cd ₂₀	16,41 ± 1,77	– " –
Зерно ячменю, вирощене на природному та геоаномальних ґрунтових фонах			
12	Pb ₀ Zn ₀ Cd ₀	19,64 ± 3,8	На рівні контролю
13	Pb ₁₀₀ Zn ₅₀ Cd ₂	19,13 ± 1,49	– " –
14	Pb ₁₀₀₀ Zn ₅₀₀ Cd ₂₀	23,36 ± 4,01	– " –
Зерно сої, вирощене на природному та геоаномальних ґрунтових фонах			
15	Pb ₀ Zn ₀ Cd ₀	19,51 ± 1,96	На рівні контролю
16	Pb ₁₀₀ Zn ₅₀ Cd ₂	18,38 ± 0,93	– " –
17	Pb ₁₀₀₀ Zn ₅₀₀ Cd ₂₀	21,6 ± 2,83	– " –

*Фон – це природний вміст важких металів у конкретному досліджуваному ґрунті (для використаного в дослідженні ґрунту – Pb – 10, Zn – 5, Cd – 0,2 мг/кг ґрунту)

Згідно з даними, наведеними в табл.1, частота летальних мутацій у контролі та у варіанті досліджу з використанням водної витяжки ґрунту з природним фоном забруднення свинцем, статистично не відрізняється. Статистично достовірних відхилень щодо частоти летальних мутацій не спостерігалось і у варіантах дослідження, в яких як фактор впливу використовували зерно сільськогосподарських культур (варіанти з 9 по 17). Деякі інші результати були зафіксовані при аналізі водних екстрактів ґрунтів, до яких було додатково внесено певні кількості свинцю. З таблиці видно, що внесення в ґрунт додаткових доз свинцю призводило до підвищення частоти летальних мутацій, навіть у кількості 5 мг/кг ґрунту. Найвищу частоту летальних мутацій було зафіксовано в 7 варіанті досліджу.

Тест на частоту рекомбінаційних подій у статевих хромосомах *Drosophila melanogaster* на ділянці між генами *w* і *st*. Основою біологічного різно-

маніття є мінливість різних організмів. Одним з типів мінливості є так звана комбінаторна мінливість, яка, з одного боку, базується на перекомбінуванні хромосом в процесі мейозу, з іншого боку, – на механізмах гомологічної рекомбінації, яку також називають кросинговером. Фактори, що впливають на частоту кросинговеру можуть призводити як до зниження, так і до підвищення частоти рекомбінації. Тому вплив таких факторів не може бути байдужим для виду в цілому [13].

Відповідно до результатів, поданих у табл. 1, статистично достовірні відхилення від контролю були відмічені лише в 7 варіанті досліджу. Тобто лише внесення в ґрунт додаткових кількостей свинцю в розмірі 200 мг/кг призводило до зниження частоти рекомбінації, в усіх інших варіантах досліджу впливу аналізованого фактора не зафіксовано.

Згідно з результатами проведеного дослідження підвищення вмісту важких металів у ґрунті до 100 фонів

супроводжується зростанням їхніх концентрацій у зерні сої, ячменю та пшениці, але відповідно до обох тестів не впливає на генетичну активність зерна. При аналізі водних витяжок ґрунту лінійної залежності між вмістом свинцю в ґрунті та силою і характером впливу водних екстрактів на генетичні процеси у дрозофіли не встановлено, незважаючи на те, що навіть внесення в ґрунт свинцю в дозі 5 мг/кг сухої маси призводило до підвищення частоти мутацій. Безперечно цікавим є той факт, що найвищу частоту летальних мутацій та єдине статистично достовірне відхилення частоти рекомбінації було зафіксовано в 7 варіанті досліду (Pb₂₀₀), але слід ураховувати, що ґрунт – це складна екосистема і незначний вплив неврахованого фактора може позначитись на результатах досліджу.

Тест на частоту летальних мутацій в статевій хромосомі *D. melanogaster* при аналізі водних екстрактів ґрунту виявився більш показовим, ніж метод атомної абсорбції. Отже, необхідно поглиблювати дослідження з використанням *D. melanogaster* – як біотестом в агроландшафтах, оскільки це дає можливість виявити екологічний дисбаланс в системі на первинних етапах токсикологічного забруднення компонентів агросистеми й локалізувати його на першій ланці трофічного ланцюга – ґрунті.

Висновки. 1. Внесення в ґрунт свинцю в кількості 200 мг/кг ґрунту призводить до зниження частоти рекомбінації в статевій хромосомі *Drosophila melanogaster*. на ділянці між генами *w* і *ct*.

2. Внесення в ґрунт свинцю в кількості від 5 до 500 мг/кг сухого ґрунту призводить до підвищення частоти летальних мутацій у статевій хромосомі *Drosophila melanogaster*.

3. Не встановлено лінійної залежності між дозами свинцю в ґрунті й силою і характером впливу водних витяжок ґрунтів на генетичні процеси у дрозофіли.

4. Підвищення рівня важких металів у ґрунті до 100 фонів не впливає на генетичну активність зерна сої, ячменю та пшениці, вирощеного в умовах забруднення.

5. З'ясування причин виявлених закономірностей опосередкованого впливу важких металів на генетичні процеси у *D. melanogaster* потребує подальшого вивчення.

1. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. – М., 1989. – С. 97–108. 2. Рушковский С.П. Особенности проявления хромосомной нестабильности при культивировании лимфоцитов периферической крови человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – К., 1994. – С. 10–12. 3. Бессонова В.П. Цитогенетические эффекты воздействия тяжелых металлов на рост и развитие растений. – Запорожье, 1999. 4. Baker D.E., Chesnin L. // *Advances in Agronomy*. – 1975. – Vol. 27. – P. 306–366. 5. Gerber G.B., Leonard A., Jaquet P. // *Advances in Agronomy*. – 1980. – Vol. 76. – № 2. – P. 115–141. 6. Cottenie A., Verloo M. // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 1984. – Vol. 317, № 3-4. – P. 389–393. 7. Vaglenov A., Carbonel E., Marcos R. Biomonitoring of workers exposed to lead. Genotoxic effects, its modulation by poliviramin treatment and evaluation of the induced radioresistance // *Mutation research* // 1998. – Vol. 418. – P. 79–92. 8. Бессонова В.П. Методи фітоіндикації в оцінці екологічного стану довкілля. – Запорожжя, 2001. – С. 170–186. 9. Roberts D.B. *Drosophila* a practical approach. – Oxford, 1986. 10. Медведев Н.Н. Практическая генетика. – М., 1965. – С. 158–176. 11. Ватти К.В., Тухомирова М.М. Руководство к практическим занятиям по генетике. – М., 1979. – С. 43–46. 12. Березина Ю.М. Возрастная ценопопуляций *Taraxacum officinale* s. l. и химические загрязнения // *Фундаментальные и прикладные проблемы популяционной биологии: Тез. докл. VI Всерос. популяц. семинара, Нижний Тагил, 2–6 дек. 2002 г.* – Нижний Тагил, 2002. – С. 53–55. 13. Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. – М., 1985. – С. 228–258.

Надійшла до редколегії 30.09.04

УДК 582.232

Н.А. Воробей, провід. інж., С.Я. Коць, д-р біол. наук,
О.В. Пацко, студ., Т.В. Паршикова, д-р біол. наук

ВПЛИВ ІНОКУЛЯЦІЇ НАСІННЯ АЗОТФІКСУЮЧИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ НА РІСТ І РОЗВИТОК РОСЛИН ЛЮЦЕРНИ

Проведено мікроевтаційні дослідження щодо використання для стимуляції росту рослин люцерни моно- та бінарних інокулятів, створених на основі бульбочкових бактерій і водорості. Одержані результати свідчать про необхідність підбору найефективніших композицій азотфіксуючих мікроорганізмів, способу їх внесення та визначення співвідношення інокуляційних агентів.

The guide microvegetation experiment of using mono-and binaries inoculus for stimulation of plants growing (created on the base of Rhizobiums and algae). It was found necessity of selection the most effective complexes of nitrofixation microorganisms, the way of their bringing and determinated the correlation of inoculus agents.

Вступ. Забезпечення рослин достатньою кількістю азоту є важливою і достатньо гострою проблемою сучасного землеробства. Негативні зміни азотфіксуючої здатності мікрофлори ґрунтів унаслідок різноманітних причин (хімізації, нестачі вологи, органічних сполук тощо) ускладнюють проблеми створення продуктивних азотфіксуючих симбіозів мікроорганізмів у зоні кореневих систем навіть таких бобових рослин, як люцерна (*Medicago L.*). Це й зумовлює необхідність пошуку шляхів формування ефективних симбіотичних ценозів азотфіксаторів за рахунок різноманітних живих культур мікроорганізмів, що здатні зв'язувати атмосферний азот [1]. Ефективна взаємодія мікро- і макроорганізмів у симбіотичній системі діазотрофи – рослина забезпечує активацію процесу фіксації атмосферного азоту, продукування біологічно активних сполук, під впливом яких поліпшується живлення рослин, підвищується їхня продуктивність, поліпшується якість сільськогосподарської продукції.

Пошук організмів, здатних виступати як інокуляційні агенти і формувати симбіози на коренях рослин [2],

а також створення на їх основі біопрепаратів для ефективного використання біологічного азоту можна вважати стратегічним напрямом досліджень у сфері симбіотичної та асоціативної азотфіксації. Це відкриває широку перспективу підвищення продуктивності агробіоценозів, а також можливість усунення загрози нітратного забруднення одержаної рослинної продукції, що має особливе значення для приготування екологічно чистих кормів.

Метою наших досліджень було вивчення взаємодії ряду мікроорганізмів із числа бактерій і синьозелених водоростей, здатних до азотфіксації, з люцерною як фактора відповідного підвищення родючості ґрунтів, урожайності рослин і поліпшення якості сільськогосподарської продукції.

Об'єкт і матеріали досліджень. Об'єктом досліджень була люцерна посівна (*Medicago sativa*) сорту Ярославна. Для інокуляції насіння люцерни були залучені виробничий штам 425а *Sinorhizobium meliloti* (раніше *Rhizobium*) із колекції ІФРГ НАН України (Київ), три його Tn5-транспозонові мутанти (Т37, Т38, Т39), які були