

УДК 575.224.4 575.224.23

Л. Лазаренко, канд. біол. наук, В. Безруков, канд. біол. наук

СТАБІЛЬНІСТЬ ХРОМОСОМ У НАСІННІ ЦИБУЛІ ГРАНЧАСТОЇ (*ALLIUM ANGULOSUM* L.)

*Досліджено рівень хромосомної нестабільності у насінні цибулі гранчastoї (*Allium angulosum* L.). Спонтанна частота аберантних анафаз в меристемі проростків з молодого насіння становить 2-3%. Виявлено високі темпи зростання хромосомної нестабільності при зберіганні насіння протягом 13 місяців (ЧАА до 56%)*

*The level of chromosome instability in seeds of mouse garlic (*Allium angulosum*) was evaluated. The basic spontaneous level of anaphases with chromosome aberrations was about 2-3%. The data are given on the dynamics of chromosome instability during 13 months of storage (up to 56% of aberrant anaphases frequency).*

В системі заходів по збереженню навколишнього середовища важливе місце посідає генетичний моніторинг – системне спостереження за станом генофонду популяцій, що дозволяє оцінювати існуючий мутаційний процес та прогнозувати його зміни.

Для адекватної оцінки впливу факторів середовища на зміни геному необхідною умовою є знання спонтанних, вихідних рівнів хромосомної мінливості. Незважаючи на величезну кількість опублікованих цитогенетичних робіт, спонтанний рівень хромосомної нестабільності відомий далеко не для всіх видів. Можна вважати, що хромосомна нестабільність певною мірою вивчена для об'єктів, що використовуються як модельні при тестуванні на генотоксичність факторів різної природи. Зокрема, до рослинних цитогенетично досліджених об'єктів належать види цибулі, скерди, пшениці, гороху, кукурудзи, ячменю та деяких інших [1, 2]. В той же час з багатьох видів цибулі (рід *Allium* L.) широко відомі як модельні об'єкти *A. sepa* (цибуля ріпчаста) та *A. fistulosum* (цибуля трубчаста, або татарка, вона ж – батун), і саме – завдяки класичному Allium-тесту, запропонованому Леваном у 1936 році для тестування мутагенної активності хімічних сполук [3]. Інші види цибулі досліджувались переважно з позицій їх господарської та споживчої цінності.

Оскільки важливою умовою одержання адекватних оцінок впливу чинників різної природи на біоту є розширення спектру об'єктів досліджень, метою даної роботи був аналіз вихідного, базового рівня нестабільності хромосом та дослідження динаміки проявів хромосомної нестабільності у насінні цибулі гранчastoї (*Allium angulosum* L.). Дані про стабільність хромосом цього виду в науковій літературі відсутні.

Матеріал та методика

Цибуля гранчаста (*Allium angulosum*) – вид, який розповсюджений досить широко, але в деяких регіонах стан її природних популяцій оцінений як загрозливий, зокрема на території Болгарії, де серед 4-х зникаючих видів цибулі станом на 1984 рік згадувалась і цибуля гранчаста [4], та на території Закарпатської області, де рішенням обласної ради у 2008-му році цибуля гранчаста занесена до "Регіонального червоного списку" судинних рослин, що підлягають особливій охороні [5].

У дослідженнях використовували насіння цибулі гранчastoї різних років репродукції (1995, 1996 та 2003 рр) однієї і тієї ж популяції розташованої на околиці м. Остер Чернігівської області. Зібране в кінці серпня насіння зберігалось в лабораторії, в темній шафі, в негерметично закритому скляному посуді. Пророщували насіння у термостаті при температурі 24°C, в чашках Петрі з дистильованою водою. Проростки довжиною 4-9 мм фіксували у фіксаторі Кларка (суміш 96% етанолу та льодяної оцтової кислоти: 3:1). Для аналізу аберацій хромосом готували тимчасові давлені препарати, фарбовані ацеторсеїном ("Merck", Germany). Клітини кореневої меристеми проростків аналізували анафазним методом, який передбачає облік аберацій на стадії анафази та ранньої телофази мітотичного циклу [6].

Оскільки будь-які дані про стабільність хромосом досліджуваного нами об'єкта в науковій періодиці відсутні, цитогенетичний аналіз проводився нами без орієнтування чи обмеження кількості матеріалу (клітин): аналізували всі проростки вказаної довжини, що вдалося зібрати, не нехтуючи малою кількістю насіння, зібраного в 1996 році.

Основним кількісним показником стабільності хромосом є **частота аберантних анафаз (ЧАА)** – частка анафаз з абераціями від загальної кількості проаналізованих клітин, виражена в процентах.

Для одержання першого уявлення про ступінь пошкодженості аберантних клітин обчислюють такий показник як **пошкодженість аберантної клітини (ПАК)** – відношення кількості аберацій до кількості аберантних клітин, виражене в процентах [7]. Ми розглядаємо цей показник як кількість аберацій на 100 клітин. При обчисленні цього показника не враховують клітини з множинними абераціями, тобто коли кількість аберацій не дає змоги їх порахувати. Такі клітини (мультіаберантні анафази – МА) аналізують окремо, виділяючи як показник. І цей показник – **частота мультіаберантних анафаз (ЧМАА)** – частка анафаз з множинними абераціями від загальної кількості аберантних анафаз, виражена в процентах, доповнює картину пошкодженості клітин. Крім того, нами проведено поклітинний розподіл аберацій і обчислено кількість аберацій на аберантну клітину (**КАБАК**) з урахуванням стандартної похибки [8]. Орієнтуючись на деякі роботи та на результати власних досліджень, мультіаберантними клітинами в Allium-тесті вважаємо анафази (а також ранні телофази) з п'ятьма і більше абераціями [9, 10]. А пошкодженість аберантної клітини розглядаємо як інтегральний показник, що об'єднує **кількість аберацій, що припадає на одну аберантну клітину (КАБАК) і частоту мультіаберантних анафаз (ЧМАА)**. Оскільки ці параметри мають різну динаміку, доцільно розглядати їх як взаємодоповнюючі [9, 10].

Спектр аберацій хромосом аналізували за **частотою дицентриків (ЧД)** – частка дицентриків від загальної кількості аберацій всіх видів, виражена в процентах) та **частотою подвійних дицентриків (ЧПД)** – частка подвійних дицентриків від загальної кількості дицентриків, виражена в процентах).

Результати та обговорення

Цитогенетичні показники клітин кореневої меристеми проростків з молодого насіння цибулі гранчastoї трьох років репродукції: 1995-го, 1996-го та 2003-го наведено у таблиці 1. Власне, про стабільність хромосом свідчать такі показники, як частота аберантних анафаз і показники пошкодженості КАБАК (кількість аберацій на одну аберантну клітину) та ЧМАА (частота мультіаберантних анафаз). Як видно з таблиці 1, частота аберантних анафаз у молодому насінні цибулі гранчastoї репродукції 1995 та 2003 років знаходиться на рівні 2%. Пошкодженість аберантної клітини за показником КАБАК дещо вища у насінні репродукції 1995 року; мультіаберантні клітини відсутні.

Нульове значення частоти анафаз з абераціями у насінні репродукції 1996-го року, звичайно, може бути випадковим, але для проаналізованих корінців серед всіх (140) проаналізованих клітин (анафаз та ранніх

телофаз) не виявлено жодної аберантної. При цьому не спостерігались навіть "проблемні" клітини, тобто такі, що за анафазним методом не враховуються, з огляду на непевність аберацій.

Таблиця 1. Аберації хромосом в клітинах кореневої меристеми проростків *Allium angulosum* з молодого насіння (1995, 1996 та 2003) різних років репродукції

Вік насіння, міс	Кількість анафаз (в дужках – аберантних)	ЧАА, %	ПАК	КАБАК	ЧМАА	ЧД	ЧПД
Насіння репродукції 1995 року							
0,25	774(22)	2,8±0,6	123	1,13±0,22	0	74,1±8,4	40,0±11,0
Насіння репродукції 1996 року							
1	140(0)	0	0	0	0	0	0
Насіння репродукції 2003 року							
1	120(3)	2,5±1,4	100	1,00±0,00	0	33,3 (1)*	0

Примітка: * – в дужках зазначено кількість для пояснення недоцільності стандартної похибки.

Через різку втрату схожості насіння після року зберігання вікову динаміку хромосомної нестабільності у насінні гранчатої цибулі вдалося простежити лише

протягом першого року. Дані, з яких постає картина вікової динаміки цитогенетичної нестабільності досліджуваного насіння, зведено в таблиці 2.

Таблиця 2. Вікова динаміка пошкодженості хромосом у насінні *Allium angulosum* з насіння різних років репродукції протягом пожиттєвого зберігання

Вік насіння, міс	Кількість анафаз (в дужках – аберантних)	ЧАА, %	ПАК	КАБАК	ЧМАА	ЧМ	ЧПМ
Насіння репродукції 1995 року							
0,25	774(22)	2,8±0,6	123	1,13±0,22	0	74,1±8,4	40,0±11,0
7	212(43)	20,3±2,7	160	1,51±0,37	2,4% (1)*	35,8±5,9	37,5±9,9
12	20(9)	45,0±11,1	144	1,45±0,05	0	30,8±12,8	25,0±21,7
13	141(37)	26,2±3,7	144	1,38±0,23	2,7% (1)*	59,6±8,3	25,8±7,9
Насіння репродукції 2003 року							
1	120(3)	2,5±1,4	100	1,00±0,00	0	33,3 (1)*	0
12	154(35)	22,7±3,4	171	1,45±0,32	0	36,7±6,2	4,5(1)*
13	299(168)	56,2±2,9	193	1,84±0,50	21,4±3,1	43,1±3,1	41,1±4,1

Примітка: * – в дужках зазначено кількість для пояснення недоцільності стандартної похибки.

Як видно з даних таблиці 2, розвиток хромосомної нестабільності при зберіганні насіння цибулі гранчатої відбувається значно швидше, ніж у насінні батуну. Так, раніше було показано що нестабільність хромосом у насінні *A. fistulosum* значно вища від такої у *A. сера*: на третьому році зберігання генетично однорідного насіння батуну одного й того року репродукції ЧАА в клітинах кореневої меристеми проростків може складати 9%, 18%, 27%, – залежно від техногенного забруднення довкілля [11], в той час як у цибулі ріпчастої вона рідко перевищує 10%. Незважаючи на високі темпи вікового зростання хромосомної нестабільності у насінні батуну, мультиаберантні клітини в проростках останнього з'являються в більшості не раніше 2-го та 3-го років зберігання [12]. У насінні цибулі гранчатої вже на першому році зберігання з'являються мультиаберантні анафази (табл. 2).

Аналіз спектру аберацій хромосом показав, що тенденція до зниження частки дицентриків досить помітна для насіння репродукції 1995-го року і відсутня для насіння 2003-го року. Щодо динаміки дицентриків хромосомного типу у насінні 1995-го року, їх частка протягом року зменшується, в той час як для насіння 2003-го року спостерігається тенденція до зростання (табл. 2). Подібні неоднозначні зміни в спектрі аберацій свідчать про те, що пошкодження геному у насінні протягом зберігання може відбуватися в різні періоди інтерфази, незважаючи на віковий стан насіння, або ж про те що клітини зародку при дозріванні насіння "фіксуються" на різних стадіях інтерфази.

Поява мультиаберантних клітин в проростках цибулі гранчатої на першому році зберігання насіння свідчить про високу нестабільність геному, а отже і потенційну вразливість хромосом до впливу факторів різної природи, їх сумарного ефекту, інтенсивності, флуктуації та експозиції.

Таким чином, встановлено, що тривалість життя дослідженого нами насіння цибулі гранчатої за звичайних лабораторних умов дуже коротка – 12-13 місяців. За таких умов насіння цибулі ріпчастої зберігає життєздатність протягом 3-х років, а батуну – 4-5 років [9, 10, 12, 13]. Цитогенетичний моніторинг природної популяції цибулі гранчатої виявив високу нестабільність хромосом як за частотою аберантних анафаз, так і за пошкодженістю клітин. Крім того, швидкість наростання хромосомної нестабільності перевищує рівні, характерні для насіння батуну. Тому використання цибулі гранчатої як модельного об'єкту в тест-системах може мати досить обмежене застосування з урахуванням наведених особливостей проявів хромосомної нестабільності. В той же час, для моніторингу екологічного благополуччя, динаміки сумарного впливу довкілля на геном цибулі гранчатої як модельний об'єкт може виявитись навіть більш вдалим, ніж батун, з огляду на короткий період життя насіння та швидкість вікових змін стабільності хромосом.

Таким чином, одержані дані можуть бути використані як при плануванні заходів з охорони генофонду (умови зберігання насіння), так і як вихідні величини при використанні цибулі гранчатої як тест-об'єкту в системі екологічного моніторингу.

1. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных хими-ческих веществ. // ВОЗ. – Женева – 1989. С.: 13-25, 86-97, 152-160.
2. Grant W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens // Mutat. Res. 1994. V. 310. P. 175-185.
3. Grant W.F. Chromosome aberration assays in Allium // Mutat. Res. – 1982. – V99. – P. 273-291.
4. ЧЕРВЕНА КНИГА НА НР БЪЛГАРИЯ. ТОМ 1. РАСТЕНИЯ. ИЗДАТЕЛЬСТВО НА БЪЛГАРСКАТА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ, СОФИЯ, 1984. – 447 с. (С.: 65-66).
5. Ф.Д. Гамор, А.Ф. Гамор, Т.М. Антосяк. Регіональний червоний список судинних рослин Закарпаття та деякі практичні аспекти їх охорони // Науковий вісник Ужгородського університету Серія Біологія, Випуск 25, 2009: 89-107.
6. Демидов С.В., Безруков В.Ф., Сиволоб А.В., Козерецька І.А.,

Лазаренко Л.М., Рушковський С.Р., Александрова О.І., Топчій Н.М. Загальна і молекулярна генетика. Практикум. Київ, 2005. – 239 с. 7. Гостимський С.А., Дьякова М.И., Ивановская Е.В., Монахова М.А. Практикум по цитогенетике: Методическое пособие. – Изд-во Москов. ун-та, 1974. – 171 с. 8. Лакін Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 349 с. 9. Куцоконь Н.К., Безруков В.Ф., Лазаренко Л.М., Рашидов Н.М., Гродзинський Д.М. Кількість аберацій на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабільності. 1. Характеристика дозових залежностей // Цитология и генетика. – 2003. – 37, № 4. – С. 20-25. 10. Куцоконь Н.К., Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф., Рашидов Н.М., Гродзинський Д.М. Кількість аберацій на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабільності. 2. Порівняльний аналіз впливу факторів різної природи

// Цитология и генетика. – 2004. – 38, № 1. – С. 55-62. 11. Bezrukov V. F., Lazarenko L.M.. Environmental impact on age-related dynamics of karyotypical instability in plants // Mutation Research, 2002, October, Vol.520/1-2, P.113-118. 12. Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф. Динаміка хромосомної нестабільності батуну (*Allium fistulosum* L.): вплив температури зберігання насіння // Цитология и генетика, 2008. – №5. – С.: 54-60. 13. Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф. Динаміка хромосомної нестабільності в насінні батуну (*Allium fistulosum* L.) різних років репродукції // Вісник Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Серія Біологія. – Івано-Франківськ: Гостинець.2007б. – Вип. VII-VIII. – С.265-267.

Надійшла до редколегії 08.11.11

УДК 619 : 636.09, : 616.98

I. Наконечний, д-р біол.наук

ЕКОЛОГО-ЕПІЗООТИЧНИЙ ПІДХІД ПРИ ЕПІДЕМІЧНІЙ ОЦІНЦІ ФАУНІСТИЧНИХ УГРУПОВАНЬ СТЕПОВОЇ ЗОНИ ПІВДНЯ УКРАЇНИ

На основі результатів досліджень щодо закономірностей та регіональних особливостей структурно-функціональної організації паразитоценозів, пов'язаних з фауністичними угрупованнями степової зони, значно розширено уявлення про єдину екологічно-соціальну сутність епізоотичних і епідемічних проявів природних інфекцій у регіоні. Оперативна та прогностична оцінки біобезпеки середовища з урахуванням видового складу фауністичних комплексів та механізмів біоценотичної саморегуляції забезпечують ефективний епідемічний контроль щодо природно-осередкових інфекцій.

Studies of the patterns and regional features of the structural and functional organization of parasite communities associated with faunistic complexes of the steppe zone have markedly broadened our apprehension of the integral eco-social nature of epizootic and epidemic manifestations of natural infections in the region. Operative and prognostic assessment of habitat safety taking into account the species composition of its faunistic complexes and the mechanisms of its biocenotic self-regulation ensures efficient epigemic control of natural nidal infections.

Вступ. Для рівнинних степових біотопів загалом характерне переважання спеціалізованих стенотопічних видів, які є найбільш уразливими до порушень середовища існування, тож по мірі його антропогенного перетворення здавна відбувались зміни ареалів і видової структури зональних біотичних комплексів. Сучасна різноманітність рослинних угруповань мозаїчних біотопів регіону визначає досить високі захисні та кормові умови для існування аборигенних і акліматизованих видів тварин і птахів. Одночасно із заміною типово ксерофітної степової рослинності на "синтетичні" угруповання агроландшафту, останні створюють умови для проникнення та існування в степовій зоні багатьох алохтонних видів тварин [6].

Ключове значення у цих процесах мали такі фактори, як суцільне розорювання степів, насадження лісосулиць, створення систем зрошення та штучних водойм. Панування монокультур та перехід до механізованих методів обробки землі практично ліквідували дрібно-мозаїчний ландшафт, що значно погіршило умови для виживання більшості степових видів рослин і тварин. Руїнація первинних степових біоценозів знайшла своє закономірне відображення в дестабілізації місцевих паразитарних систем, одним із наслідків чого стали потужні епізоотичні спалахи природних інфекцій та інвазій, у які часто "включаються" свійські тварини та людина [11]. Особливо показовими в цьому плані є масові епізоотії (сибірської виразки, емфізематозного карбункулу, кровопаразитарних інвазій тощо) XIX століття, які лише на території Новоросійської губернії щороку спричиняли загибель більш як 100 тис. голів великої рогатої худоби та овець [3].

Виникнення масових епізоотій в Північному Причорномор'ї було зумовлено швидким заміщенням диких копитних (сайгак, джейран, кінь-тарпан) свійськими видами, які забезпечили різку активацію місцевих паразитарних систем (первинного типу). За цих умов закономірним наслідком діяльності природного інфекційного регулятора, не обмеженого системними факторами, став активний епізоотичний процес, стимульований чисельними шляхами передачі інфекту в стадах свійських тварин [9]. Незважаючи на значні порушення струк-

турної організації первинних паразитарних систем та зникнення частини резервуарних видів тварин – носіїв збудників, на сучасній території регіону існують всі умови для активації природно-осередкових інфекцій, небезпечних для свійських тварин і людини. Відповідно, характер змін видової структури, чисельності та ареалів представників фауністичних угруповань у зоні антропогенно трансформованих територій, має ключове значення в оцінках епізоотичного (епідемічного) стану та активності функціонування існуючих паразитарних систем. У зв'язку із цим, метою роботи є теоретична розробка методу еколого-епізоотичної оцінки окремих біоценотичних угруповань щодо їх епідемічного потенціалу.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження носили комплексний характер, що зумовило необхідність використання різноманітних – загальнобіологічних і спеціальних наукових методів досліджень. Специфіка даної роботи, орієнтована на розкриття міжелементних взаємозв'язків у природних осередках інфекцій, передбачала спеціальні зоологічні, популяційні, мікробіологічні, епізоотологічні та епідеміологічні методи досліджень. Останні, в свою чергу, поєднані із різноманітними методами польових, клінічних, лабораторних, патологоанатомічних і паразитологічних методів досліджень. Вказані дослідження були базовані на стандартних, загальноприйнятих методиках. Додатково, в незначній кількості, були використані окремі методики, які добре відомі в біології та медицині, але не входять в число стандартних (пошук антитіл класу G тощо).

За період досліджень виконано 433 маршрутних обліки загальною довжиною більше 1300 км, досліджені зоологічні, стаціональні, епізоотичні та ландшафтно-біотопічні характеристики наявних географічних зон і провінцій південно-західного Причорномор'я. При польових дослідженнях обстежено 2319 особин ссавців різних видів, у тому числі 1714 гризунів, а також 227 особин птахів, обліковано нори та слідові маршрути тварин. Найбільші обсяги фактичного матеріалу були отримані завдяки комплексним польовим дослідженням та обстеженням значних площ різних біотопів у їх сезонній і багаторічній мінливості. Вказані дослідження базовані на стандартних методиках зоологічних, паразитологічних і епідеміологіч-