

УДК 575.826

Т. Є. КОПИТЧУК, асп.,**С. В. БІЛОКОНЬ**, к.б.н., доц.**О. Л. СІЧНЯК**, к.б.н., доц.Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра генетики і молекулярної біології, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна

ВПЛИВ ГЕРБІЦИДІВ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER* І. Визначення генотоксичного ефекту гербіцидів методом ДЛМ

Вивчали мутагенну дію препаратів Раундап, Селефіт та Напалм, які широко застосовуються в сільськогосподарському виробництві. Як тест-об'єкт використовували *Drosophila melanogaster*, застосовуючи метод домінантних летальних мутацій (ДЛМ). Усі гербіциди викликали велику кількість домінантних летальних мутацій, які обраховували за кількістю аномальних яєць.

Ключові слова: життєздатність, гербіциди, дрозофіла, мутації.

Надійний захист посівів від бур'янів є однією з головних умов отримання високих врожаїв. В останні роки внаслідок порушення сівозмін, використання спрощеної агротехніки різко зросла потенційна засміченість орного шару ґрунту насінням бур'янів, яка в різних ґрунтово-кліматичних зонах України досягла рівня 1,14–1,47 млрд шт/га. За вегетаційний період на одному м² орних земель здатні проростати від 1100 до 2300 сходів бур'янових рослин [6]. Все це значно підвищує попит на гербіциди. Пестициди нового покоління позиціонуються як відносно безпечні. Поширене використання гербіцидів у сільському господарстві призвело до глобального розповсюдження їх у біосфері. В свою чергу, прямий чи опосередкований вплив цих сполук на біологічні угруповання може призвести до накопичення різного роду мутацій та, як наслідок, змінення структури природних популяцій та зникнення найбільш чутливих до подібного впливу видів [9]. Це ставить перед дослідниками завдання обов'язкового та ретельного вивчення впливу пестицидів на навколишнє середовище шляхом фізіологічного, біохімічного та генетичного моніторингу із застосуванням різноманітних тест-систем [3]. У численних дослідженнях показаний мутагенний ефект гербіцидів на різних тваринних і рослинних об'єктах [1; 3; 6; 9]. Таким чином, питання про мутагенну активність гербіцидів, як і раніше, залишається актуальним [2; 4]. Метою дослідження було визначення впливу на життєздатність дрозофіли деяких сучасних гербіцидів, а також оцінка їх можливої мутагенної активності.

Матеріал та методи

Генотоксичність гербіцидів досліджували за допомогою методу обліку домінантних летальних мутацій [5]. Суть даного методу полягає у виявленні індукованих генетичних змін, які виникають у зародкових клітинах

батьків і ведуть до загибелі нащадків на різних стадіях ембріонального розвитку. Оцінювали вплив гербіцидів Раундап (ізопропіламінна сіль гліфосату, 480 г/л, 48% водний розчин), Селефіт (прометрин, 500 г/л) та Напалм (ізопропіламінна сіль гліфосату, 480 г/л). Селефіт та Напалм належать до класу малотоксичних препаратів [2], а Раундап – до помірно токсичних. Імаго дрозофіли обробляли перорально. Використовували віргінних самиць дикого типу С—S. На дно пробірки заливали гаряче живильне середовище, засівали його дріжджовою суспензією з гербіцидами в досліді та дистильованою водою в контролі. Використовували робочий розчин гербіцидів (Напалм: 0,01 мг/1 мл; Селефіт: 0,08 мг/мл ; Раундап: 0,012 мг/мл) та розведення 1:1 від робочої концентрації. Домінантні летальні мутації виявляли на початкових стадіях розвитку першого покоління дрозофіли. Після 72 годин обробки досліджуваним препаратом мух висаджували у пробірки із живильним середовищем для схрещування (по 10 самців і самиць). Через добу самиць відсаджували на агарові пластинки, які утримували в термостаті при температурі 25°C. Через вісім годин самиць видаляли. Облік доміантних летальних мутацій здійснювали через 48 годин від початку яйцекладки. Личинки та нормальні яйця, які ще не розвинулися, враховували як норму. Аномальні яйця ділили за кольором на три типи:

- прозорі – незапліднені;
- матові – рання ембріональна загибель (перші 9 годин ембріонального розвитку);
- забарвлені (від жовтих до коричневих) – пізня ембріональна загибель.

Статистичне опрацювання виконували за допомогою критерію Стьюдента [7].

Результати та обговорення

В ході дослідження було виявлено, що однократне додавання до корму імаго препаратів гербіцидів у робочій концентрації призводила до виникнення індукованих генетичних змін у статевих клітинах батьків. Збільшення кількості недорозвинених яєць у порівнянні із контролем свідчить про виникнення доміантних летальних мутацій у дослідних варіантах, які можуть утворюватися внаслідок значних перебудов хромосом, анеуплоїдій, пошкоджень цитоплазматичних структур, порушення реплікації ДНК і генних мутацій. Результати досліді наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Частота (%) нормальних та аномальних яєць *Drosophila melanogaster* за впливу гербіцидів Раундап, Напалм та Селефіт

Варіант досліді	Норма	Прозорі	Матові	Забарвлені
Контроль	94,1 ± 2,3	4,9 ± 2,3	—	1,0 ± 1,0
Раундап	36,1 ± 6,1	11,5 ± 4,1	6,6 ± 3,2	45,9 ± 6,4
Напалм	67,92 ± 1,97	7,54 ± 6,63	1,88 ± 0,05	22,6 ± 4,20
Селефіт	39,0 ± 7,6	22,0 ± 5,1	12,2 ± 5,1	26,8 ± 6,9

Збільшення кількості недорозвинених яєць спостерігалось за використання всіх досліджуваних гербіцидів з високим ступенем вірогідності ($P \leq 0,001$). У той самий час привертає увагу відмінність у реакції *Drosophila melanogaster* на обробку різними препаратами. Найбільша кількість мутацій спостерігалася при обробці гербіцидом Раундап. Нормальні яйця в цьому варіанті досліду склали лише $36,1 \pm 6,1\%$, у той час як у контролі кількість нормальних яєць становила $94,1 \pm 2,3\%$.

У ході досліду спостерігали всі три типи недорозвинених яєць: прозорі, матові та забарвлені (рис. 1). Серед забарвлених найчастіше зустрічалися темно-коричневі.

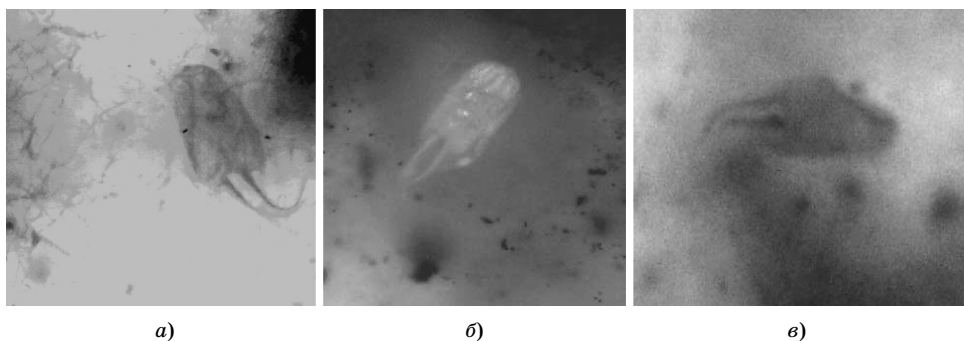


Рис. 1. Аномальні прозорі (а), матові (б) та забарвлені (в) яйця *Drosophila melanogaster*. Збільшення 40×10 .

Найчастішим типом порушень виявилось утворення забарвлених яєць, що свідчить про пізню загибель ембріонів (табл. 1). У варіанті досліду з гербіцидом Раундап забарвлені яйця склали майже половину від їх загальної кількості ($45,9 \pm 6,4$). Найменший показник цієї аномалії ($22,6 \pm 4,2$) був при обробці гербіцидом Напалм, у той час як у контролі показник забарвлених яєць сягнув лише $1,0 \pm 1,0$. Привертають увагу дуже різні показники аномальних яєць за використання гербіцидів Селефіт та Раундап. Слід враховувати, що діючі речовини та їх концентрації в цих препаратах однакові (*N*-фосфонометил-гліцин, $C_3H_8NO_5P$), а реакція на додавання в живильне середовище препаратів суттєво відрізнялась. Кількість забарвлених яєць за обробки Селефітом склала $26,8 \pm 6,9$, а при додаванні гербіциду Раундап $45,9 \pm 6,4$. Це може пояснюватися реакцією на допоміжні речовини препаратів. Відомо, що Раундап, окрім *N*-фосфонометил-гліцину, містить ще десять «інертних» компонентів, серед яких: ізопропіламин, Собінова кислота, сульфат натрію, гідроокис калію та ін. [8].

Тестування генотоксичності Раундапу провадилось і раніше. Так, під час вивчення мутагенної активності гліфосату у складі гербіциду Раундап щодо *Drosophila melanogaster* з використанням методу обліку рецесивних, пов'язаних зі статтю мутацій, виявився вірогідний генотоксичний ефект препарату [9]. Під час проведення нами дослідження генотоксичності Раундапу методом обліку домінантних летальних мутацій кількість нормальних яєць знижувалася майже в три рази порівняно з контролем. Внаслідок обробки препаратом серед яєць спостерігалися всі типи порушень, але найчастіше зустрічалися забарвлені яйця темно-коричневого кольору.

Ретельний генетичний моніторинг найбільш широко розповсюджених у сільському господарстві пестицидів доводить їх мутагенну активність щодо

Drosophila melanogaster. Дослідження пестицидів групи гербіцидів довели, що обробка живильного середовища призводить до виникнення численних точкових мутацій та мікроделецій у нащадків [10]. Під час проведення експерименту всі досліджувані препарати показали вірогідну мутагенну активність. Обробка гербіцидом Селефіт знизила кількість нормальних яєць до 39,0%, а кількість аномальних яєць, навпаки, підвищувалася.

Додавання до кормової суміші препарату Напалм, як і у попередніх варіантах досліду, призвело до зменшення частки нормальних яєць до 67% та збільшення частки аномальних яєць. Серед аномалій найчастіше зустрічаються темно-коричневі яйця, що вказує на пізню ембріональну загибель і підтверджує негативний вплив гербіцидів на життєздатність *Drosophila melanogaster*.

Висновки

1. Додавання гербіцидів до кормової суміші призводило до зниження життєздатності яєць у всіх дослідних варіантах.
2. Дія препаратів гліфосату (Раундап, Селефіт) була більш жорсткою, ніж дія препарату прометрину (Напалм).
3. Пізня ембріональна загибель складала основну частку аномалій.

Література

1. Айрапетян Р. Б. Цитогенетическая активность некоторых инсектицидов на хромосомный аппарат лука // Биолог. журн. Армении. – 1987. № 2. – С. 14–18.
2. АгроУкраїна [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://agro.ua.net/plant/chemicaldefence/protect>;
3. Кожуро Ю. И., Максимова Н. П. Анализ цитогенетического действия гербицидов трфлан и зенкор на растения ячменя. – Беловежская пуща, 2009. – С. 216–218.
4. Кравчук О. П. Принципові підходи до гігієнічного регламентування пестицидів з урахуванням їх мутагенної активності: Матеріали наук.-практ. конф. “Актуальні проблеми екогігієни і токсикології”. – К., 1998. – Ч. 1. – С. 136–142.
5. Методичні рекомендації щодо оцінки якості ветеринарних препаратів за показником їх мутагенної дії на моделі *Drosophila melanogaster* Mg, як тест-системи in vivo / В. О. Ушкалов, М. В. Бабкін, Д. С. Тімченко, О. А. Лаврик. – К.: Держ. наук.-контрольний ін-т біотехнології і штамів мікроорганізмів, 2008. – 21 с.
6. Мордереєв Є. Ю. Фізіологічні основи комплексного застосування гербіцидів: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук.
7. Рокицький П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышэйш. шк., 1973. – 319 с.
8. Kato T., Yamagata H. E. Stage dependency of high-temperature effect on homoeologous chromosome pairing in wheat-rye F1 plants // Jap. J. Genet. – 1982. – V. 57, № 2. – P. 155–162.
9. Dr. Purushottam G., Kale M. Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture // Environmental and Molecular Mutagenesis – 1995. – V. 25, Issue 2, P. 148–153.
10. Torres, G. Ribas, N. Xamena, A. Creus and R. Marcos. Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test C. // Mutation Research/ Genetic Toxicology – 1992. – V. 280, Issue 4. – P. 291–295.

Т. Е. Копытчук, С. В. Белоконь, О. Л. Сечняк

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина

**ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

I. Определение генотоксического эффекта гербицидов методом ДЛМ

Резюме

Изучали мутагенное влияние препаратов Раундап, Селефит и Напалм, которые широко используются в сельскохозяйственном производстве. Как тест-объект использовали *Drosophila melanogaster*, применяя метод доминантных летальных мутаций (ДЛМ). Все гербициды вызывали большое количество доминантных летальных мутаций, которые проявлялись в виде окрашенных, матовых и прозрачных яиц.

Ключевые слова: жизнеспособность, гербициды, дрозофила, мутации.

T. E. Kopytchuk, S. V. Belokon, O. L. Sechnyak

Odesa National Mechnykov University, Department of Genetics
and Molecular Biology,
Dvoryanska Str., 2, Odesa, 65082, Ukraine

**THE INFLUENCE OF HERBICIDES ON *DROSOPHILA MELANOGASTER*
VIABILITY.**

I. The definition of genotoxic herbicides effect by DLM-method

Summary

The herbicides Roundup, Napalm and Selefite widely used at present have been studied. They were tested for their mutagenicity using the *Drosophila melanogaster* dominant lethal mutation assay (DLM). All chemicals caused a significant number of dominant lethal mutations, showed up as a transparent mat and painted oocytes.

Key words: viability, herbicides, *Drosophila*, mutations.