

УДК 575.224

С. В. БІЛОКОНЬ, к.б.н., доц.**В. С. СКЛЯР**, магістр

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики і молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ГЕНОТОКСИЧНИЙ ЕФЕКТ ГЕРБИЦИДІВ І ПЛОДЮЧІСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Вивчали генотоксичний вплив препаратів гербіцидів «Раундап Макс», «Селефіт» та «Напалм» на ембріональний та постембріональний розвиток дрізофіли. Застосовували метод обліку рецесивних зчеплених зі статтю летальних мутацій (РЗСЛМ), а також показники плодючості мух за кількістю лялечок та імаго. Отримані на дрізофілі дані доводять, що всі досліджувані препарати гербіцидів виявляли мутагенну активність, причому дія препаратів гліфосату («Раундап Макс», «Напалм») була більш вираженою, ніж дія препарату прометрину («Селефіт»).

Ключові слова: гербіциди, мутагенність, генотоксичність, плодючість, *Drosophila melanogaster*.

Масштабне використання хімічних засобів захисту рослин є одним з найважливіших факторів інтенсифікації сучасного сільськогосподарського виробництва. В даний час активне застосування знаходять понад 600 видів пестицидів, для синтезу яких використовуються більше ніж 1500 видів хімічних сполук. Здатність пестицидів до тривалого збереження в навколишньому середовищі і виражена біологічна активність дозволяють віднести їх до числа найнебезпечніших забруднювачів навколишнього середовища [9]. Для виявлення генотоксичної активності окремих факторів навколишнього середовища в теперішній час використовується понад 200 різноманітних генетичних тест-систем, серед яких тестування на рецесивні зчеплені зі статтю летальні мутації у дрізофіли входить в перелік обов'язкових тестів для оцінки мутагенної та канцерогенної активності [6].

Метою дослідження було виявлення мутагенної активності препаратів гербіцидів «Раундап Макс», «Селефіт» та «Напалм» методом Меллер-5, а також оцінка сумарного ефекту токсичної та мутагенної дії вказаних гербіцидів на показник плодючості дрізофіли.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження є *Drosophila melanogaster* Mg. (Diptera Drosophilidae). Дослідження проводили на мухах лінії дикого типу *Canton-S*, яким властива висока плодючість і життєздатність та добре вивчений рівень мутабільності [3; 4].

В досліді визначали вплив препаративних форм гербіцидів «Раундап Макс» (ізопропіламінна сіль гліфосату, 607 г/л, реєстрація в Україні до 31.12.2018 р.), «Селефіт» (прометрин, 500 г/л, реєстрація в Україні до 31.12.2013 р.) та «Напалм» (ізопропіламінна сіль гліфосату, 480 г/л, реєстрація в Україні до 31.12.2014 р.), які належать до класу малотоксичних препаратів [1].

Генотоксичність гербіцидів досліджували за допомогою методу обліку рецесивних зчеплених зі статтю летальних мутацій (РЗСЛМ) [2; 10]. Даний метод

дозволяє здійснювати кількісний облік рецесивних летальних мутацій, що виникають в Х-хромосомі зрілих сперматозоїдів самців дрозофіли. Самців, які отримували гербіцид у кормі протягом 48 годин, віком 3–5 днів, схрещували з віргінними самицями лінії Меллер-5. Проводили індивідуальні схрещування сім'ями, по 2 мухи на пробірку (1♂ і 1♀). Всього обробляли гербіцидами по 75 самців кожного варіанту. Через дві доби мух вилучали з пробірки, оскільки на третій день у заплідненні беруть участь статеві клітини, що знаходилися на стадії сперматид на момент обробки самців. Через 9–10 днів проводили аналіз мух F_1 тільки дводенних яйцекладок. Аналіз РЗСЛМ здійснювали в другому поколінні. Частоту леталей визначали як частку (%) Х-хромосом, що несуть летальну мутацію, від загальної кількості проаналізованих Х-хромосом.

Крім того визначали сумарний ефект токсичної та мутагенної дії вказаних гербіцидів на показник плодючості дрозофіли як один із найважливіших компонентів пристосованості. Для цього пару мух утримували на живильному середовищі, до якого додавали розведені гербіциди «Селефіт» та «Напалм» у кількості 0,1 мл у розрахунку на 10 мл води та «Раундап Макс» у кількості 0,04 мл на 10 мл води, а в контрольному варіанті – дистильовану воду. Підрахунок нащадків F_1 здійснювали за кількістю лялечок та імаго.

Статистичне опрацювання проводили за критерієм Стюдента [8].

Результати дослідження та обговорення

Результатами досліджень останнього десятиріччя підтверджено потенційну небезпеку для здоров'я людини гліфосатвмісних препаратів [7; 11; 12; 13]. Так, за вивчення мутагенної активності гліфосату у складі гербіциду «Раундап» з використанням методу обліку рецесивних зчеплених зі статтю мутацій на дрозофілі, виявився вірогідний генотоксичний ефект цього препарату [12].

За даними словацьких вчених *Sivikova K.* та *Dianovsky J.*, (2006), гліфосат у формі ізопропіламіної солі у діапазоні доз від 56 до 1120 $\mu\text{моль/л}$ статистично достовірно індукуює сестринські хроматидні обміни в лімфоцитах периферійної крові бика [11]. У інших дослідях, проведених у Туреччині, вивчено *in vivo* генотоксичність комерційного гліфосату на прісноводних золотих рибках (*Carassius auratus*) у концентраціях 5, 10 та 15 $\mu\text{моль/л}$. Встановлено достовірне дозозалежне зростання кількості мікроядер, аномальних ядер та пошкоджень ДНК у периферичних еритроцитах через 48, 72 і 96 годин [13].

В наших попередніх дослідях на дрозофілі зі з'ясування генотоксичності «Раундапу» методом обліку домінантних летальних мутацій кількість нормальних яєць у пробах знижувалася майже втричі порівняно з контролем [5].

Облік рецесивних летальних мутацій в Х-хромосомі самців за методом Меллер-5 показав, що у 29,33 % сімей після додавання в кормову суміш самців гербіциду «Раундап Макс» серед нащадків F_2 не було самців дикого типу. Після додавання в живильне середовище самців гербіциду «Напалм» серед нащадків F_2 не було самців дикого типу в 16 сім'ях (частота виникнення РЗСЛМ – 21,33 %), а після додавання гербіциду «Селефіт» частота рецесивних летальних мутацій склала 16 % (табл. 1).

Відомо, що домінантні летальні мутації реалізуються на різних стадіях онтогенезу дрозофіли – ембріональній (ембріональна летальність) та постембріональній (постембріональна летальність) [3].

Таблиця 1

Індукція рецесивних зчеплених зі статтю летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* за впливу гербіцидів

Варіант досліді	Число проаналізованих Х-хромосом самців	Число Х-хромосом з летальними у нащадків F ₂	Частота РЗСЛМ, %
Контроль	60	2	3,33 ± 0,99
«Раундап Макс»	75	22	29,33 ± 2,67
«Селефіт»	75	12	16,00 ± 2,34
«Напалм»	75	16	21,33 ± 2,13

В нашому досліді реалізація ефектів домінантних летальних мутацій на постембріональних стадіях розвитку дрозофіли призводила до достовірного зниження показників плодючості мух у всіх варіантах досліді порівняно з контролем (табл. 2).

Найменша кількість лялечок та імаго спостерігалася у варіанті досліді з гербіцидом «Раундап Макс» і складала 60,12 % і 38,84 % від відповідних показників у мух лінії C-S. Найбільша кількість лялечок та імаго була відмічена в досліді з гербіцидом «Селефіт» – 76,90 % і 73,55 % відповідно від показників мух лінії C-S. У варіанті досліді з гербіцидом «Напалм» плодючість мух за кількістю лялечок була майже такою, як і у варіанті з «Раундапом Макс», а показник плодючості за кількістю імаго хоча і був дещо вищим, але складав приблизно 56 % від кількості імаго в контролі (табл. 2). Більш жорстка дія препаративної форми «Раундап Макс» порівняно з «Напалмом», очевидно, пов'язана з реакцією на додаткові речовини препаратів. В роботі Н. М. Недопитанської (2011) наведено ряд даних стосовно більшої токсикологічної небезпеки препаративних форм порівняно з самим гліфосатом [7].

Таблиця 2

Вплив гербіцидів на показники плодючості дрозофіли

Варіанти	Кількість лялечок на 1 сім'ю		Кількість імаго на 1 сім'ю	
	M ± m	%	M ± m	%
Контроль	94,50 ± 4,20	100	62,00 ± 2,34	100
«Раундап Макс»	56,82 ± 6,50*	60,12	24,08 ± 7,15 *	38,84
«Селефіт»	72,67 ± 6,40*	76,90	45,60 ± 8,60 *	73,55
«Напалм»	64,40 ± 5,25*	68,14	34,55 ± 6,60 *	55,73

Примітка: * – відмінності порівняно з «контролем» достовірні при P < 0,01; n = 40–50.

Отримані дані доводять, що всі досліджувані препарати гербіцидів виявляли статистично достовірну мутагенну активність, причому дія препаратів гліфосату («Раундап Макс», «Напалм») була більш вираженою, порівняно з дією препарату прометрину («Селефіт»).

Висновки

1. Додавання гербіцидів «Раундап Макс», «Напалм», «Селефіт» у рекомендованих до використання кількостях до кормової суміші призводить до зниження виживаності мух на різних стадіях онтогенезу.
2. Найбільша частота рецесивних зчеплених зі статтю летальних мутацій спостерігається за впливу гербіциду «Раундап Макс».
3. Вплив препаратів гліфосату («Раундап Макс», «Напалм») був більш вираженим порівняно з препаратом прометрину («Селефіт»).

Список використаної літератури

1. *АгроУкраїна* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://agroua.net/plant/chemicaldefence/protect>.
2. Білоконь Е. М. Методические указания к определению мутагенной активности химических препаратов на дрозофиле / Е. М. Білоконь. – Львов: Из-во ЛГУ, 1984. – 26 с.
3. Волкова Н. Е. Влияние возраста родителей на половое поведение *Drosophila melanogaster* / Н. Е. Волкова, Н. В. Немчук, Л. И. Воробьева // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2005. Вип. 1–2. – № 709. – С. 77–84.
4. Іванов Ю. Н. Определение количества спонтанных доминантных летальных мутаций в геноме *Drosophila melanogaster* / Ю. Н. Іванов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15, № 3. – С. 595–599.
5. Копитчук Т. Є. Вплив сучасних гербіцидів на життєздатність *Drosophila melanogaster* / Т. Є. Копитчук, С. В. Білоконь, О. Л. Січняк // Вісник Національного Університету. – 2011. – Т. 16. – Вип. 6. – С. 47–51.
6. Ушкалов В. О. 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. Тимченко, О. А. Лаврик / К.: Держ. наук.-контрольний ін-т біотехнології і штамів мікроорганізмів, 2008. – 21 с.
7. Недопитанська Н. М. Проблема канцерогенної небезпеки гліфосату: нові дані / Н. М. Недопитанська // Сучасні проблеми токсикології. – 2011. – Т. 1–2. – С. 5–15.
8. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 319 с.
9. Саратовских Е. А. Генотоксичность пестицидов в тесте Эймса и их способность к образованию комплексов с ДНК / Е. А. Саратовских, В. М. Глазер, Н. Ю. Костромина, С. В. Котелевцев // Экологическая генетика. – 2007. – Т. 5, № 3. – С. 46–54.
10. Тихомирова М. М. Генетический анализ. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. – 280 с.
11. Sivikova K. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes / K. Sivikova, J. Dianovsky // International Journal of Hygiene and Environmental Health. – 2006. – Vol. 209, № 1. – P. 15–20.
12. Torres C. Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test / C Torres, G. Ribas, N. Xamena, A. Creus, R. Marcos. // Mutation Research/ Genetic Toxicology – 1992. – Vol. 280, Issue 4. – P. 291–295.
13. Tolga Cava. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay / Tolga Cava, Serpil Konen. // Mutagenesis, 2007. – Vol. 22, Issue 4. – P. 263–268.

Стаття надійшла до редакції 15.11.2012

С. В. Белокоп, В. С. Скляр

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

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ГЕРБИЦИДОВ И ПЛОДОВИТОСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Резюме

Изучали генотоксическое влияние препаратов гербицидов «Раундап Макс», «Селефит» и «Напалм» на эмбриональное и постэмбриональное развитие дрозофилы. Использовали метод учета рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ), а также показатели плодовитости мух по количеству личинок и имаго. Полученные на дрозофиле данные показали, что все исследованные препараты гербицидов проявляли мутагенную активность, причем действие препаратов глифосата («Раундап Макс», «Напалм») было более выраженным, чем действие препарата прометрина («Селефит»).

Ключевые слова: гербициды, мутагенность, генотоксичность, плодовитость, *Drosophila melanogaster*.

S. V. Belokon, V. S. Sklyar

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

GENETOXICAL EFFECT OF HERBICIDES AND FECUNDITY OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Summary

Was studied the genotoxic effect of the drugs of herbicides «Roundup Max», «Selefit» and «Napalm» on embryonic and postembryonic development of drosophila. Was used the accounting methods of recessive lethal mutations linked with sex, as well as fertility rates by the number of pupae and imago. The results showed that all the investigated drugs herbicides caused mutagenic activity. The influence of glyphosate drugs was stronger than of prometrin drugs.

Key words: herbicides, mutagenicity, genotoxicity, fecundity, *Drosophila melanogaster*.