УДК 575.224:575.826

С. В. Білоконь, І. Л. Сінокос, А. О. Ніжевич

ПРИСТОСОВАНІСТЬ ТА РЕПРОДУКТИВНА ФУНКЦІЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЗА ВПЛИВУ ГЕРБІЦИДІВ

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики і молекулярної біології; e-mail: belokonsv2012@gmail.com

Ключові слова: *мутагенність, генотоксичність, життєздатність, гербіциди, дрозофіла.*

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 типу мутацій і, як наслідок, до зміни їх генетичної структури, що може призвести до зникнення найбільш чутливих до подібного впливу генотипів [14]. Це ставить перед дослідниками завдання обов'язкового та ретельного вивчення впливу пестицидів на представників різних видів шляхом фізіологічного, біохімічного та генетичного моніторингу із застосуванням різноманітних тест-систем [6]. У численних дослідженнях на різних тваринних і рослинних об'єктах показано мутагенний ефект гербіцидів [1; 13; 15; 18]. Однак генотоксичний вплив нових впроваджених у сільське господарство гербіцидів на життєздатність і репродуктивну функцію тваринних об'єктів досліджено недостатньо. В зв'язку з цим, питання про генотоксичну активність гербіцидів, як і раніше, залишається актуальним [2; 7].

Метою дослідження було визначення впливу деяких сучасних гербіцидів на окремі складові загальної пристосованості D. melanogaster, а саме на показники ембріонального та постембріонального розвитку мух.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом досліджень слугувала *Drosophila melanogaster* Mg. *(Diptera Drosophilidae*). Дослідження провадили на лінії дрозофіли дикого типу *Canton-S*, якій властива гарна життєздатність, висока плодючість та добре вивчений рівень мутабільності [4; 5].

Генотоксичність гербіцидів досліджували за допомогою методу обліку домінантних летальних мутацій (ДЛМ) [3; 9], а також рецесивних летальних мутацій зчеплених зі статтю (РЗСЛМ) [12].

Суть методу ДЛМ полягає у виявленні індукованих генетичних змін, які виникають за наявності гербіцидів у живильному середовищі в зародкових клітинах батьків і ведуть до загибелі нащадків на різних стадіях ембріонального розвитку. Оцінювали вплив 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.). Вважається, що Раундап Макс, Селефіт та Напалм належать до класу малотоксичних препаратів [2].

Імаго дрозофіли отримували гербіциди перорально. На дно пробірки заливали гаряче живильне середовище, засівали його дріжджовою суспензією з гербіцидами в досліді та дистильованою водою в контролі. Використовували робочі розчини гербіцидів та розведення 1:1 від робочої концентрації. Домінантні летальні мутації виявляли на початкових стадіях розвитку першого покоління мух. Через 72 години перебування фертильних мух на середовищі з гербіцидами їх висаджували у пробірки із стандартним живильним середовищем для схрещування (по 10 самців і самиць). Через добу самиць відсаджували на агарові пластинки, які утримували у термостаті при температурі 25°С. Через вісім годин самиць вилучали. Облік домінантних летальних мутацій здійснювали через 48 годин від початку яйцекладки. Личинки та нормальні, ще не розвинені яйця, враховували як норму. Недорозвинуті яйця поділяли за кольором на два типи:

- білі (матові) – рання ембріональна загибель (перші 6–9 годин ембріонального розвитку);
- забарвлені (від жовтих до коричневих) – пізня ембріональна загибель.

Всього було проаналізовано по 5 агарових пластинок у кожному варіанті досліду.

Частоту домінантних летальних мутацій визначали як співвідношення яєць, що не розвинулися, до загальної кількості яєць.

Облік рецесивних зчеплених зі статтю летальних мутацій провадили за методом Меллер-5 [12]. Даний метод дозволяє здійснювати кількісний облік рецесивних летальних мутацій, що виникають в Х-хромосомі зрілих сперматозоїдів самців дрозофіли. Самців, які отримували гербіцид у кормі, віком 3–5 днів, схрещували з віргінними самицями лінії Меллер-5. Схрещування проводили 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 і перевіряли в третьому поколінні. Частоту леталей визначали як частку (%) Х-хромосом, що несуть летальну мутацію, від загальної кількості проаналізованих Х-хромосом.

Вивчали також сумарний ефект токсичної та мутагенної дії вказаних гербіцидів впливати на показник плодючості дрозофіли як один із найважливіших компонентів пристосованості. Для цього пару мух постійно утримували в пробірці з живильним середовищем, до якого

додавали робочу концентрацію гербіциду в досліді та дистильовану воду в контролі. Підрахунок нащадків F_1, що виникли за цих умов, вели за кількістю лялечок та імаго.

Статистичне опрацювання виконували за допомогою критерію Стьюдента [11].

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

В ході дослідження домінантних летальних мутацій було з'ясовано, що однократне додавання до корму імаго препаратів гербіцидів як у робочій, так і зменшеній вдвоє концентрації призводило до виникнення індукованих генетичних змін у статевих клітинах батьків. Збільшення кількості недорозвинених яєць у порівнянні із контролем свідчить про виникнення за наявності гербіцидів у середовищі домінантних летальних мутацій у піддослідних мух. Ці мутації можуть виникати внаслідок значних структурних перебудов хромосом, анеуплоїдій, порушення реплікації та репарації ДНК, генних мутацій, а також інших ушкоджень генетичних детермінантів [10].

Збільшення сумарного рівня ДЛМ спостерігалося за використання всіх досліджуваних гербіцидів з високим ступенем вірогідності (табл. 1).

Таблиця 1. Індукція домінантних летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* за впливу гербіцидів

Варіант досліду	Норма, %	Відсоток незаплідненних яєць, %	Відсоток яєць з ранніми ДЛМ, %	Відсоток яєць з пізніми ДЛМ, %	Сумарний рівень ДЛМ, %
Контроль	94,10 ± 2,30	5,90 ± 1,88	–	–	5,90 ± 1,88
Раундап Макс роб. конц.	36,10 ± 6,10	11,50 ± 4,10	6,60 ± 3,20	45,90 ± 6,40	52,50 ± 7,20
Раундап Макс 1:1	49,05 ± 1,91	7,54 ± 6,63	15,09 ± 1,34	28,30 ± 1,81	35,60 ± 2,40
Селефіт роб. конц.	53,94 ± 1,97	13,15 ± 1,71	7,89 ± 4,97	25,00 ± 2,08	30,89 ± 3,99
Селефіт 1:1	67,92 ± 1,97	7,54 ± 6,63	1,88 ± 0,05	22,60 ± 4,20	24,48 ± 2,72
Напалм роб. конц.	39,0 ± 7,60	22,00 ± 5,10	12,20 ± 5,10	26,80 ± 6,90	36,85 ± 6,23
Напалм 1:1	48,83 ± 3,95	18,60 ± 1,61	6,97 ± 0,02	25,58 ± 1,65	32,55 ± 2,65

Однак слід звернути увагу на суттєві відмінності ефективності прояву генотоксичних ефектів окремих гербіцидних препаратів у досліді.

Найбільша кількість домінантних летальних мутацій спостерігалася при обробці гербіцидом Раундап Макс, сумарний рівень яких досяг 52,5 ± 7,2 %. Нормальні яйця в цьому варіанті досліду склали лише 36,1 ± 6,1 %, у той час як у контролі кількість нормальних яєць була на рівні 94,1 ± 2,3%. У ході досліду спостерігали всі типи недорозвинених яєць: прозорі, матові та забарвлені. Серед забарвлених найчастіше зустрічалися темно-коричневі. У всіх варіантах досліду найчастішим типом порушень

виявилося утворення забарвлених яєць, що свідчить про пізню загибель ембріонів. Дані літератури вказують на високу чутливість зрілих сперматозоїдів до впливу хімічних речовин. Це пов'язано з тим, що ефективність репарації на стадії зрілих сперматозоїдів виявляється суттєво зниженою чи взагалі відсутньою [8].

У варіанті досліду з гербіцидом Раундап Макс забарвлені яйця складали майже половину від їх загальної кількості (45,9 ± 6,4). Найменший показник цієї аномалії (22,6 ± 4,2) був у випадку застосування гербіциду Селефіт у розведенні 1:1. Привертають увагу дуже різні показники аномальних яєць за використання гербіцидів Напалм та Раундап Макс. Слід враховувати, що діючі речовини в цих препаратах однакові (N-(фосфонометил)–гліцин, C3H8NO5P), а реакція на додавання в живильне середовище препаратів суттєво відрізнялася. Сумарний рівень ДЛМ за обробки Напалмом склав 36,85 ± 6,23 %, що майже на 30 % менше за рівень мутацій при додаванні гербіциду Раундап. Це може пояснюватися реакцією на допоміжні речовини, що входять у склад препаратів. Відомо, що Раундап, окрім N-фосфонометил–гліцину, містить ще десять «інертних» компонентів, серед яких: ізопропіламин, сульфат натрію, гідроокис калію та ін. [16].

Тестування генотоксичності Раундапу провадилося і раніше. Так, за вивчення мутагенної активності гліфосату у складі гербіциду Раундап з використанням методу обліку рецесивних, зчеплених зі статтю мутацій, виявився вірогідний генотоксичний ефект препарату на *D. melanogaster* [14]. Дослідження пестицидів групи гербіцидів довели, що їх наявність у живильному середовищі призводить до виникнення численних точкових мутацій та мікроделецій у нащадків [13]. Ще в 90-х роках минулого століття була показана більша токсичність препаративної форми (Раундапу) порівняно з самим гліфосатом як за параметрами гострої токсичності [17], так і генотоксичності [13; 18]. Саме з дією Раундапу автори пов'язували виявлене в експериментах на мишах збільшення кількості аддуктів ДНК [19] та слабкий мутагенний еффект у тесті на *Salmonella* [15], тоді як сам гліфосат цих ефектів не виявляв. У дослідженнях на культурах лімфоцитів периферійної крові людини *in vitro* препаративна форма гербіциду Раундап викликала статистично достовірне збільшення частоти сестринських хроматидних обмінів і підвищувала індукцію мікроядер у кістковому мозку мишей [13]. В наших дослідах по з'ясуванню генотоксичності Раундапу Макс методом обліку домінантних летальних мутацій, кількість нормальних яєць у пробах зменшувалась майже втроє порівняно з контролем.

Облік рецесивних летальних мутацій в Х-хромосомі самців за методом Меллер-5 (табл. 2) 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 %.

Таблиця 2. Індукція рецесивних зчеплених зі статтю летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* за впливу гербіцидів

Варіант досліду	Число проаналізованих Х-хромосом	Число Х-хромосом з леталями	Частота РЗСЛМ, %
Контроль	60	2	3,33 ± 0,99
Раундап Макс роб. конц.	75	22	29,33 ± 2,67
Селефіт роб. конц.	75	12	16, 00 ± 2,34
Напалм роб. конц.	75	16	21,33 ± 2,13

Отримані на дрозофілі дані доводять, що всі досліджувані препарати гербіцидів виявляли статистично достовірну мутагенну активність, причому дія препаратів гліфосату (Раундап Макс, Напалм) була більш вираженою, ніж дія препарату прометрину (Селефіт).

Відомо, що домінантні летальні мутації реалізуються на різних стадіях онтогенезу дрозофіли – на ембріональній (ембріональна летальність) та постембріональній (постембріональна летальність). В нашому досліді реалізація ефектів домінантних летальних мутацій на постембріональних стадіях розвитку дрозофіли призводила до достовірного зниження показників плодючості мух у порівнянні з контролем (табл. 3).

Таблиця 3. Вплив гербіцидів на показники плодючості дрозофіли (n = 40–50)

Варіанти дослідів	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 роб. конц.	56,82 ± 6,50*	60,12	24,08 ± 7,15 *	38,84
Селефіт роб. конц.	72,67 ± 6,40*	76,90	45,60 ± 8,60 *	73,55
Напалм роб. конц.	64,40 ± 5,25*	68,14	34,55 ± 6,60 *	55,73

* Вірогідність відмінностей у порівнянні з контролем, $P < 0,01$

Найменша кількість лялечок та імаго спостерігалася у варіанті досліду з гербіцидом Раундап Макс і складала 60,12 % і 38,84 % від відповідних показників у мух лінії *C-S*. Найбільша кількість лялечок та

імаго нараховувалась в досліді з гербіцидом Селефіт – 76,90 % і 73,55 % відповідно від показників мух лінії *C-S*. Реальна плодючість мух після обробки Напалмом була трохи більшою за плодючість мух після обробки Раундапом і дещо меншою, ніж після обробки мух Селефітом (P ≥ 0,05).

ВИСНОВКИ

1. Додавання гербіцидів до кормової суміші *D. melanogaster* призводило до зниження життєздатності мух на різних стадіях онтогенезу у всіх дослідних варіантах.
2. Негативна дія препаратів гліфосату (Раундап Макс, Напалм) на показники пристосованості мух була більш виразною, ніж дія препарату прометрину (Селефіт).
3. Сумарний рівень домінантних летальних мутацій і найбільша частота рецесивних летальних мутацій зчеплених зі статтю, спостерігалися за впливу гербіциду Раундап Макс.
4. Потрапляння гербіцидів в організми тварин може супроводжуватись суттєвими генотоксичними ефектами, які пригнічують репродуктивну функцію.

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: // agroua.net/plant/chemicaldefence/protect;
3. Белоконь Е.М. Методические указания к определению мутагенной активности химических препаратов на дрозофиле – Львов: из-во ЛГУ, 1984. – 26 с.
4. Волкова Н.Е., Немчук Н.В., Воробьева Л.И. Влияние возраста родителей на половое поведение *Drosophila melanogaster* // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2005. Вип. 1–2. – № 709 . – С. 77–84.
5. Іванов Ю.Н. Определение количества спонтанных доминантных летальних мутацій в геноме Drosophila melanogaster // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2011. – Т.15. – №3. – С. 595–599.
6. Кожуро Ю.И., Максимова Н.П. Анализ цитогенетического действия гербицидов трефлан и зенкор на растения ячменя. – Беловежская пуща, 2009. – С. 216–218.
7. 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.
8. Магерамова Л.М. Изучение закономерности мутагенного процесса в линях дрозофилы, дефектных по системам репарации: Автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.15 / МГУ. – М., 1985. – 18 с.
9. 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.
10. Недопитанська Н. М. Проблема канцерогенної небезпеки гліфосату: нові дані // Сучасні проблеми токсикології . – 2011. – Т. 1–2. – С. 5–15.

11. Рокицький П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышэйш. шк., 1973. – 319 с.
12. Тихомирова М.М. Генетический анализ. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. – 280 с.
13. Bolognesi C., Bonatti S., Degan P. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1997. – Vol. 45. – Issue 5. – P. 1957–1962.
14. 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.
15. Kale P.G., Petty B.T.Jr., Walker S. Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture // Environmental and Molecular Mutagenesis, 1995. – Vol. 25. – Issue 2. – P.148–153.
16. 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.
17. Martinez T.T., Long W. C., Hiller W. C Comparison of the toxicology of the herbicide Roundup by oral and pulmonary routes of exposure // Proceedings of the Western Pharmacology Society, 1990. – Vol. 33. – P. 193–197.
18. 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.
19. Peluso M., Munnia A., Bolognesi C., Parodi Postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 1998. – Vol. 31. – Issue 1. – P. 55–59.

С. В. Белоконь, И. Л. Сенокос, А. А. Нижевич

ПРИСПОСОБЛЕННОСТЬ И РЕПРОДУКТИВНАЯ ФУНКЦИЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЕРБИЦИДОВ

Ключевые слова: *мутагенность, генотоксичность, жизнеспособность, гербициды, дрозофила.*

Изучали генотоксическое влияние препаратов гербицидов Раундап Макс, Селефит и Напалм, широко использующихся в сельскохозяйственном производстве, на эмбриональное и постэмбриональное развитие дрозофилы. Использовали методы учета доминантных летальных мутаций (ДЛМ), рецессивных летальных мутаций сцепленных с полом (РСПЛМ), а также показатели плодовитости по количеству личинок и имаго. Добавление гербицидов в корм *D. melanogaster* приводило к снижению жизнеспособности мух на разных стадиях онтогенеза во всех исследуемых вариантах.

S. V. Belokon, I. L. Sinokos, A. O. Nizhevych

ADAPTABILITY AND REPRODUCTIVE FUNCTION OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* UNDER THE INFLUENCE OF HERBICIDES

Keywords*: mutagenicity, genotoxicity, viability, herbicides, Drosophila.*

We studied the genetoxical effect of herbicides Roundup Max, Selephyte and Napalm, which are widely used in agricultural production, on the embryonic and postembryonic development of drosophila. We considered dominant lethal mutations (DLM), recessive lethal mutations linked with sex, and fertility rates by the number of pupae and imago. The adding of herbicides to feeding mixtures caused a decrease in the viability of flies at different stages of ontogenesis in all experimental variants.