

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ В ПРИРОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ РАСТИТЕЛЬНОГО ТЕСТ-ОБЪЕКТА

Э. А. Агаджанян, Р. Э. Авалян, А. Л. Атоянц,

А. Э. Симонян, Р. М. Арутюнян

Ереванский государственный университет,

Ереван, Армения, e-mail: a.atoyants@rambler.ru

Актуальность. В современных условиях антропогенного и техногенного воздействия на пресноводные экосистемы возникает необходимость оценки и мониторинга качества водной среды с применением чувствительных модельных тест-систем. **Объект.** Использованы маркерные биотесты Традесканции (клон 02): система волосков тычиночных нитей (Трад-ВТН) и микроядерный (Трад-МЯ), которые используются в международной практике для биотестирования наличия ксенобиотиков в окружающей среде. **Материал и методы.** Материалом служили водные пробы из оз. Севан (р-он полуострова и с. Шоржа) и рек его бассейна (Гаварагет и Дзкнагет). В водных образцах определяли концентрации химических элементов и тяжелых металлов. При проведении теста Трад-ВТН цветочные бутоны традесканции помещали в исследуемые водные образцы в течение 18 часов, затем оставляли на 7-дневный восстановительный период. В течение 21 дня проводили учет мутационных событий (рецессивные-розовые-РМС). Для каждого варианта проанализировано 18–22 тыс. тычиночных волосков. При проведении микроядерного теста (Трад-МЯ) соцветия (бутоны) обрабатывали водными пробами в течение 18 часов. Выделенные молодые пыльники фиксировали в ацеталкоголе (3:1). Готовили ацетокарминовые препараты по стандартной методике. Учитывали число микроядер на 100 тетрад. Для каждого варианта анализировали по 3000 тетрад. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Полученные результаты обрабатывали статистически с применением программы Statgraphics Plus 2.1. **Результаты.** По обоим биотестам установлено достоверное повышение частоты рецессивных мутаций (РМС) и процента микроядер (МЯ) в водных пробах рек Гаварагет и Дзкнагет по сравнению с контролем и другими вариантами. Выявлена высокая положительная корреляция между частотой РМС, МЯ и концентрацией химических элементов в изученных водных пробах (Si, P, Al, Mn, Fe, Cu). **Выводы.** Полученные данные показывают целесообразность применения обоих индикаторных биотестов (Трад-ВТН и Трад-МЯ) клона 02 традесканции в качестве экспресс-метода тестирования качества воды в изучаемых гидроэкосистемах.

Ключевые слова: традесканция (клон 02), соматические рецессивные мутации, микроядра, биотесты, загрязнение воды.

STUDYING GENETIC EFFECTS IN NATURAL ECOSYSTEMS WITH APPLICATION OF A PLANT TEST OBJECT

E. A. Aghajanyan, R. E. Avalyan, A. L. Atoyants,
A. E. Simonyan, R. M. Aroutiounian

Yerevan State University, Yerevan, Armenia, e-mail: a.atoyants@rambler.ru

Background. For the last years in Armenia water resources (Lake Sevan) have been affected by anthropogenic and technogenic impact. The process of bioindication of environmental genotoxic effects using higher plant test objects is very appropriate and effective. **Objective.** Biotesting involved *Tradescantia* stamen filament mutation (Trad-SFM) and *Tradescantia*'s micronucleus (Trad-MCN) bioassays of *Tradescantia* clone 02 test object.

Materials and methods. Genotoxicity of water samples from Lake Sevan (Armenia) and the rivers of its basin was investigated. Water samples were analysed for their chemical composition. Tap (distilled) water sample was used as a reference. For the Trad-SFM assay and Trad-MCN a young inflorescence of *Tradescantia* was dipped into the water test samples. The duration of treatment was 18 hrs (12/6 day/night cycle) in both the Trad-SFM and Trad-MCN assays. After a 7-day period of recovery, pink (recessive- RME) mutation events were traced in the flowers. Results were expressed in the terms of RME/1000 stamen filaments. For each sample, from 18,000 to 22,000 stamen filaments were obtained. Micronucleus frequencies were determined in early tetrads of pollen mother cells and expressed as MCN/100 tetrads. Three thousand tetrads represented each sample. The results were analysed with the *t*-test applying the statistical program Statgraphics Plus 2.1. **Results.** The obtained results show a significant increase in the level of recessive mutation events (RME) frequency and micronucleus (MN) in tetrads from the water samples from the Gavaraget and Dzknaget Rivers as compared with the reference and other studied samples. High positive correlation between the RME and MN frequency and the concentration of chemical elements in the water samples (Si, Al, P, Mn, Fe, Cu) were revealed. **Conclusion.** These results indicate that Trad-SFM and Trad-MCN bioassays of the *Tradescantia* clone 02 can be applied for biotesting of water quality of aquatic ecosystems.

Key words: *Tradescantia* clone 02, somatic recessive mutation, micronucleus, bioassays, water pollution.

Введение

В настоящее время одним из наиболее важных факторов, ограничивающих устойчивое развитие общества, является загрязнение природной среды различного рода ксенобиотиками. В связи с этим особую роль приобретает достоверная информация об уровнях техногенного загрязнения окружающей среды, которая может быть получена в результате правильно организованного биомониторинга. В условиях современного возрастающего антропогенного и техногенного воздействия на пресноводные экосистемы возникает практическая необходимость периодической оценки качества водной среды и экологического состояния гидроэкосистемы в целом (Bol'shakov et al., 2009).

Озеро Севан – одно из крупнейших высокогорных озер мира, уникальный пресноводный водоем, играющий большую роль в народном хозяйстве Армении. Загрязнение русла впадающих в Севан рек (28) промышленными и сельскохозяйственными отходами и бытовым мусором становится важной причиной, приводящей к нарушению гидроэкосистемы оз. Севан. Проблема нерационального использования и охраны водных ресурсов бассейна оз. Севан остается особенно актуальной (Акopyan, 2004; Oganesyanyan, 1994).

Как известно, важным элементом биомониторинга окружающей среды служат растительные организмы, как наиболее чувствительные и надежные индикаторы загрязненности биосферы. Растительные тест-системы являются достаточно чувствительными объектами для проведения не только мониторинга уровня генотоксичности, но и рекомендуются для оценки канцерогенности ксенобиотиков воздушной, водной и почвенной сред.

Среди растительных тест-объектов особо выделяются гетерозиготные клоны традесканции (клон 02), использование которых позволяет оценить индукцию мутаций под воздействием достаточно низких концентраций ксенобиотиков. На протяжении длительного периода времени клоны традесканции зарекомендовали себя как высокочувствительные тест-объекты не только для целей биологической дозиметрии, но и в качестве биодетектора химических мутагенов (Osipova, Shevchenko, 1984; Grant et al., 1992).

Традесканция (клон 02) является природным межвидовым гибридом между *Tradescantia occidentalis* Britton Rudb. и *T. ohiensis* Raf. и представляет диплоидное растение ($2\times = 12$), высота которого достигает

20–45 см. Отличается множеством побегов, на которых развиваются соцветия. В норме цветок традесканции (клон 02) имеет три голубых лепестка, окруженных тремя чашелистиками, один трехлопастный пестик и шесть тычинок. Характерной особенностью цветка является наличие на тычинке 30–50 и более волосков (но может быть и меньше), а каждый волосок, в свою очередь, состоит из 20–35 соматических клеток. Растение гетерозиготно по окраске цветка: голубая окраска детерминируется доминантным генетическим фактором (D^+), контролирующим синтез дельфинидина, а розовый цвет – рецессивным фактором (C^-), контролирующим синтез цианидина. Данный клон был интродуцирован и прекрасно прижился в резко континентальных климатических условиях Армении. Обладает мощной корневой системой, неприхотлив к почвенным условиям и очень чувствителен к загрязнителям окружающей среды, в частности, к низким концентрациям поллютантов (рисунок). Использование клона 02 традесканции в качестве тест–объекта позволяет оценивать воздействие ксенобиотиков не только на соматические клетки волосков тычиночных нитей (биотест Трад–ВТН), но и на спорогенные клетки растений (микроядерный биотест Трад–МЯ) в период микроспорогенеза.



Цветки традесканции (клон 02)
***Tradescantia* flowers (clone 02)**

Стадия активного деления клеток в волосках тычиночных нитей наиболее чувствительна для возникновения мутаций. При проведении биотеста Трад–ВТН в качестве индикаторных тест–критериев

учитываются: изменение окраски клеток–волосков тычиночных нитей с голубых на розовые (рецессивные мутационные события – РМС) и появление бесцветных клеток (неопределенные мутационные события – БМС). При тестировании, кроме соматических мутаций (РМС и БМС), также фиксируются морфологические изменения волосков – карликовые (не выжившие) волоски (НВ) и разветвленные волоски (РВ). Кроме того, учитываются нарушения в строении цветка – изменение числа тычинок (уменьшение), срастание лепестков цветка, изменение окраски цветка (с голубого на розовый или белый) и разного рода другие изменения.

Применение микроядерного теста (Трад–МЯ) позволяет фиксировать появление хромосомных aberrаций (ацентрические фрагменты или отстающие хромосомы), которые регистрируются в виде микроядер (МЯ) на стадии тетрад при нарушениях процесса микроспорогенеза. При тестировании с применением данного теста фиксируются два тест–критерия: частота образования микроядер и процент тетрад с микроядрами.

Характерной особенностью данных тест–систем (Трад–ВТН и Трад–МЯ) является их высокая чувствительность, отсутствие требования стерильности при тестировании, а также возможность одновременного учета частоты возникающих мутаций как в соматических, так и в генеративных клетках традесканции.

Многолетними исследованиями нашей научной группы была показана возможность и перспективность использования индикаторных биотестов Трад–ВТН и Трад–МЯ в практике генетического мониторинга загрязнения окружающей воздушной, водной и почвенной сред, как вблизи источников техногенного загрязнения, так и в городских условиях экологической нестабильности (Pogosyan et al., 2002; Agadzhanian et al., 2011).

Целью настоящего исследования являлось изучение уровня генотоксичности и кластогенности водных проб некоторых рек и окрестностей бассейна оз. Севан, отличающихся различной степенью техногенной загрязненности с применением двух основных биотестов (Трад–ВТН и Трад–МЯ) модельного тест–объекта традесканции (клон 02).

Материал и методика

Материалом исследования служили водные пробы рек Гаварагет и Дзкнагет, а также окрестностей бассейна оз. Севан: вблизи полуострова и

с. Шоржа. Пробы воды из исследуемых районов брали в весенний период. В исследуемых водных образцах определяли концентрацию присутствующих в них химических элементов и тяжелых металлов (NO^- , Si, P, Al, Mn, Fe, Cu). Данные за исследуемый период были любезно предоставлены Центром мониторинга окружающей среды Армении. Для выявления уровня генотоксичности и кластогенной активности изучаемых водных проб применялись соответственно биотесты – Трад–ВТН и Трад–МЯ.

При проведении тестирования волосков тычиночных нитей (Трад–ВТН) цветочные бутоны (соцветия) традесканции (клон 02) помещали в водные образцы в течение 18 часов при комнатной температуре. Опыт проводили в условиях теплицы Ереванского государственного университета (ЕГУ). По истечении срока экспозиции соцветия сначала оставляли на семидневный восстановительный период. Затем проводили ежедневный учет мутационных событий (РМС и БМС), а также – морфологических нарушений (НВ, РВ и др.) в течение 21 дня по общепринятой методике (Ma et al., 1994a). Для каждого варианта было проанализировано 18–22 тыс. тычиночных волосков.

При проведении микроядерного теста (Трад–МЯ) обработанные исследуемыми водными пробами в течение 18 часов соцветия (бутоны) традесканции без прохождения восстановительного периода фиксировали в ацеталкоголе (3:1). Готовили временные ацетокарминовые препараты по стандартной методике (Ma et al., 1994b). Учитывали основные тест–критерии: число микроядер на 100 тетрад и число тетрад с МЯ. Для каждого варианта анализировали по 3000 тетрад.

При проведении обоих тестов в качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Полученные результаты обрабатывали статистически с применением программы Statgraphics Plus 2.1. Корреляционный анализ проводили между частотой мутационных изменений в ВТН, а также частотой встречаемости микроядер в тетрадах микроспор и концентрацией химических элементов в исследуемых водных пробах.

Результаты и обсуждение

Изучение уровня генотоксичности исследуемых водных образцов на основании проведенного биотеста Трад–ВТН показало, что во всех опытных вариантах наблюдалось достоверное повышение частоты соматических мутаций (РМС и БМС), а также морфологических

нарушений в ВТН по сравнению с контрольным уровнем (табл. 1). Во всех водных пробах уровень РМС превысил контроль в 6–9 раз в зависимости от образца. Наибольшая частота мутаций отмечалась в пробах рек Дзкнагет и Гаварагет и превысила контроль в 7,5–9,0 раз соответственно. Среди наблюдаемых морфологических нарушений в ВТН увеличение частоты встречаемости НВ и РВ отмечалось во всех опытных вариантах, и их значения превысили уровень контроля в 3–5 раз. Следует отметить, что наибольшая частота встречаемости изменений типа РВ также наблюдалась в пробах рек Дзкнагет и Гаварагет. Данный факт может свидетельствовать о повышенной тератогенной активности компонентов, содержащихся в исследуемых водных образцах. Таким образом, по результатам исследования частоты нарушений в ВТН традесканции показано генотоксическое и тератогенное действие водных проб рек Дзкнагет и Гаварагет на клетки традесканции (клон 02), которое выражается в достоверном повышении уровня соматических мутаций и морфологических аномалий.

Таблица 1. Индукция генотоксических и кластогенных эффектов у традесканции (клон 02)

Table 1. Induction of genotoxic and clastogenic effects in *Tradescantia* (clone 02)

Вариант	Рецессивные соматические мутации (РМС) (1000)±m	Частота микроядер в спорогенных клетках	
		МЯ в тетрадах (%±m)	Тетрады с МЯ (%±m)
п-ов оз. Севан	1,60±0,27***	4,50±0,65**	3,30±0,56**
берег с. Шоржа	1,60±0,30***	5,60±0,72**	3,50±0,58**
р. Дзкнагет	1,90±0,30***	8,50±0,88***	6,00±0,76***
р. Гаварагет	2,30±0,35***	9,80±0,94***	7,00±0,79***
контроль	0,25±0,11	1,90±0,42	1,90±0,42

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

По полученным данным теста Трад–ВТН была отмечена достоверная положительная корреляция между уровнем РМС, а также частотой РВ и концентрациями в водных образцах некоторых ионов и химических элементов (табл. 2).

Таблица 2. Уровни корреляции между мутационными изменениями, кластогенными эффектами и химическим составом исследуемых водных проб
Table 2. The levels of correlation between mutational changes, clastogenic effects and chemical composition of the tested water samples.

Типы мутаций и изменений	Коэффициент корреляции (r)							
	Нитрат ионы мг/л	Si	Al	P	Fe	Mn	Cu	V
Соматические мутации (PMS/1000)±m	0,95**	0,99***	0,98**	0,98**	0,96**	0,95**	0,86	0,84
Морфологические изменения (PB/1000)±m	0,67	0,88	–0,14	0,82	0,95**	0,96**	0,98**	0,47
Частота МЯ в тетрадах (%/ ± m)	0,81	0,95*	0,94*	0,96*	0,99*	0,98*	0,97*	0,81
Частота тетрад с МЯ (%/ ± m)	0,79	0,95*	0,96*	0,93**	0,99**	0,99**	0,98*	0,79

* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Изучение кластогенных эффектов в генеративной сфере традесканции (клон 2) показало увеличение частоты встречаемости тест-критериев: МЯ в тетрадах в 2,5–5,0 раз, а тетрад с МЯ – в 2,0–3,5 раза во всех опытных вариантах по сравнению с контролем в зависимости от водной пробы (см. табл. 1). Интересным является тот факт, что максимальное проявление данных генетических эффектов по обоим тест-критериям также наблюдалось в вариантах рек Дзкнагет и Гаварагет, что соответствует полученным нами результатам при определении генных точковых мутаций в соматических клетках традесканции. Следует также отметить, что по данным проведенного теста число формирующихся МЯ в опытных вариантах отхватывало почти весь диапазон наблюдающихся обычно МЯ в одной клетке (1–4), что, как правило, характерно при многокомпонентном загрязнении изучаемых субстратов. В данном случае увеличение частоты формирования микроядер как результат повреждения хромосом в период микроспорогенеза свидетельствует о наличии

кластогенного эффекта, оказываемого водными пробами данных рек на спорогенные клетки традесканции.

При изучении зависимости кластогенных эффектов в клетках традесканции от содержания в водных пробах некоторых химических элементов (NO^- , Si, Al, Mn, Fe, Cu) выявлена достоверная положительная корреляция между частотой обоих тест–критериев и концентрацией находящихся в них компонентов (см. табл. 2).

Заключение

На основании проведенного нами исследования с применением двух биотестов клона 02 традесканции (Трад–ВТН и Трад–МЯ) было показано, что водные пробы рек Дзкнагет и Гаварагет отличаются как выраженной генотоксичностью по уровню соматических мутаций и морфологических нарушений в ВТН, так и высокой кластогенностью по частоте встречаемости микроядер в тетрадах микроспор по сравнению с контролем и другими вариантами.

Известно, что степень загрязненности речной воды обусловлена как неравномерностью бытовых и техногенных нагрузок, так и высоким содержанием в ней тяжелых металлов и различного рода токсичных поллютантов. По результатам наших исследований выраженное повышение уровня соматических мутаций в ВТН и частоты МЯ в спорогенных клетках традесканции, а также наблюдаемая высокая положительная корреляция с некоторыми химическими элементами в водных пробах рек Дзкнагет и Гаварагет может свидетельствовать о значительной загрязненности воды данных рек различного рода поллютантами (тяжелыми металлами, пестицидами и др.) и их влиянием на процессы, происходящие в соматической и генеративной сферах традесканции (клон 02).

В связи с этим важной задачей биомониторинга природных водных ресурсов является не только систематический контроль за содержанием химических веществ, но и экотоксикологическая оценка степени загрязнения гидроэкосистем (оз. Севан) с привлечением чувствительных индикаторных тест–объектов (в данном случае, клона 02 традесканции).

Нашими исследованиями по изучению уровня генотоксичности и кластогенности воды рек и бассейна оз. Севан подтверждается высокая информативность и целесообразность применения обоих индикаторных биотестов клона 02 традесканции (Трад–ВТН и Трад–МЯ) в системе генетического мониторинга *in situ* природных водных ресурсов в качестве

экспресс–метода тестирования наличия ксенобиотиков и адекватной оценки степени техногенной нагрузки в изучаемых гидросистемах.

References/Литература

- Agadzhanian E. A., Atoyanc A. L., Varzhapetyan A. S., Avalyan R. E., Arutyunyan R. M.* Estimation of soil pollution by heavy metals in Yerevan city with application Tradescantia clone 02 // *Uchenye zapiski EGU*. 2011. N 1. P. 44–48 [in Russian] (*Агаджанян Э. А., Атоянц А. Л., Варжапетян А. С., Авалян Р. Э., Арутюнян Р. М.* Оценка загрязненности почв г. Еревана тяжелыми металлами // *Ученые записки ЕГУ*. 2011. № 1. С. 44–48.)
- Akopyan K. A.* The anthropogenic load on water resources and their security // *Materialy Mezhdunarodnoj konferencii RE'C Kavkaz «E'kologicheskaya bezopasnost' Kavkazskogo regiona»*. 2004. Iss. 7. P. 126–128 [in Russian] (*Акопян К. А.* Антропогенная нагрузка на водные ресурсы и их безопасность // *Материалы Междунар. конференции РЭЦ Кавказ «Экологическая безопасность Кавказского региона»*. 2004. Вып. 7. С. 126–128.)
- Bol'shakov V. N., Lushhekina A. A., Neronov V. M.* Safety of biological diversity: from ecosystem to the ecosystem approach // *E'kologiya*. 2009. N 2. P. 83–90 [in Russian] (*Большаков В. Н., Луцкекина А. А., Неронов В. М.* Сохранение биологического разнообразия: от экосистемы к экосистемному подходу // *Экология*. 2009. № 2. С. 83–90.)
- Grant W. F., Lee H. G., Logan D. M., Salamone M. F.* The use of Tradescantia and Vicia faba bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment // *Mutation Research*. 1992. Vol. 270. P. 53–64.
- Ma T. H., Cabrera G. L., Chen R., Gill B. S., Sandhu S. S., Vandenberg A. L., Salamone M. F.* Tradescantia Micronucleus Bioassay // *Mutation Research*. 1994b. Vol. 310. N 2. P. 220–230.
- Ma T. H., Cabrera G. L., Cebulski-Wasilevska A., Chen R., Loarca F., Vandenberg A. L., Salamone M. F.* Tradescantia stamen hair mutation bioassay // *Mutation Research*. 1994a. Vol. 310. N 2. P. 211–220.
- Oganesyan R. O.* Lake Sevan Yesterday, Today Erevan: Gitotyun nan RA, 1994. 478 p. [in Russian] (*Оганесян Р. О.* Озеро Севан вчера, сегодня Ереван: Гитутюн НАН РА, 1994. 478 с.)
- Osipova R. G., Shevchenko V. A.* The use of Tradescantia (clones 02 and 4430) in studies on radiation and chemical mutagenesis // *Zhurnal Obshej*

Biologii. 1984. Vol. XLV. N 2. P. 226–232 [in Russian] (*Осипова Р. Г., Шевченко В. А.* Использование традесканции (клоны 02 и 4430) в исследованиях по радиационному и химическому мутагенезу // Журнал Общей Биологии. 1984. Т. XLV. № 2. С. 226–232.)

Pogosyan V. S., Aghajanyan E. A., Atoyants A. L. Mutagenicity of ground water (in the bore-holes) in Ararat Valley (Armenia) detected by Trad-SHM bioassay // Mutation Research. 2002. Vol. 518. P. 151–153.