

Біологія

УДК 574.2+575.224+614.778

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ ГРУНТІВ М. ІВАНО-ФРАНКІВСЬКА, ВИЗНАЧЕНІ ЗА ДОПОМОГОЮ ГЕТЕРОЗИГОТНИХ РОСЛИН *NICOTIANA TABACUM* Su/+

Л. Є. Ковальчук¹, О. С. Ястребова¹, І. П. Ковальчук²

¹ДВНЗ “Івано-Франківський національний медичний університет”;
76016, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2; тел. +380(342)501248

²Кафедра біологічних наук Університету; м. Летбридж (Канада)

Сучасні методи індикації ступеня мутагенного забруднення до-
вкілля базуються на використанні молекулярно-генетичних змін у
трансгенних рослин, пророцених на зразках різних ґрунтів. Нами про-
аналізовано фенотипові прояви мутації гетерозиготних рослин *Nico-
tiana tabacum* Su/+, які візуалізуються різними типами плям на листках,
залежно від інтенсивності забруднення ґрунту. Поява плям на листках
є результатом пошкодження ДНК в локусі *Su*. Рослини вирощували на
ґрунтах, забраних з п'яти різних районів міста Івано-Франківська. Об-
ласті були позначені як чисті: парк імені Т.Г. Шевченка та зелене гос-
подарство (відповідно ділянки №№ 1 і 2) та забруднені: мікрорайон Па-
січна, вул. Пулюя та сквер біля ДВНЗ «Івано-Франківський національний
медичний університет» (відповідно ділянки №№ 3, 4 і 5). Встановлено
найбільшу кількість і загальну площу плям у рослин на ділянці № 3.
Аналіз індексу інтенсивності мутацій (ІМІ), який відображає відсоток
площі листка, зайнятої плямами, виявився низьким у рослин, вирощених
на ґрунті ділянки № 1 і 2, а найвищим у рослин з ділянок №№ 3, 4 і 5.

Ключові слова: гетерозиготні рослини *Nicotiana tabacum* Su/+,
частота мутацій, інтенсивність забруднення ґрунтів

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Зростання
забруднення довкілля мутагенами різної природи зумовлює необхід-
ність пошуку модельних тест-об'єктів для ідентифікації його інтенсив-
ності [6]. Використання рослин як біомоніторів зумовлене їх важливою
функцією в біосфері як продуцентів і джерела живлення багатьох орга-
нізмів. Незважаючи на те, що рослини володіють складними та різнома-
нітними механізмами сприйняття, нагромадження, компартментації і
метаболізму факторів забруднення, вони набувають дедалі ширшого за-

стосування для тестування екологічної чистоти сільськогосподарських і промислових хімічних засобів, харчових добавок, хімічно та радіоактивно забруднених ґрунтів і води [5, 7].

Використання рослинних біосенсорів для встановлення мутагенності довкілля базується на виявленні хромосомних аберацій, особливостей та порушень мітозу в *Allium cepa*, *Tradescantia* та інших рослин, що є зручним предметом цитогенетичних досліджень [8]. Гетерозиготна за геном *Sulfur (Su)* рослина *Nicotiana tabacum* має зручні візуальні прояви мутацій цього гена, що дозволяє успішно застосовувати її для моніторингу забруднень довкілля різної природи [9].

Мета. Підвищення ефективності моніторингу ступеня мутагенного забруднення ґрунтів різних районів м. Івано-Франківська за допомогою гетерозиготних за геном *Sulfur (Su)* рослин *Nicotiana tabacum*.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були зразки ґрунтів з різних районів м. Івано-Франківська: хімічно забруднених – Пасічна, вул. Пулюя та сквер біля ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» (ІФНМУ), відносно екологічно чистих – парк імені Т.Г. Шевченка та зелене господарство (контроль). На цих зразках вирощували гетерозиготні рослини *Nicotiana tabacum (Su/+)*, які зручні для спостереження фенотипових проявів мутацій, що виникають під впливом мутагенів довкілля. Насіння рослин було люб'язно надано професором Університету м. Летбридж (Канада) Ковальчуком Ігорем Петровичем в рамках спільного наукового проекту.

Наші дослідження базувалися на тому, що, залежно від генотипів, листки рослин *Nicotiana tabacum* мають різне забарвлення: рослини дикого типу (+/+) – зелений колір, гомозиготні рослини (*Su/Su*) – жовті, не фотосинтезуючі. Гетерозиготи (*Su/+*) – фотосинтетично спроможні і мають жовто-зелений фенотип, оскільки мутація *Sulfur(Su)* рослини *Nicotiana tabacum* успадковується за типом неповного домінування. У випадку виникнення мутацій в окремих клітинах гетерозигот *Nicotiana tabacum*, їх можна спостерігати як світлі (“*albino*”) або темні (“*dark green*”) плями на загальному фоні жовто-зелених листків. Відомі поєднання світлих (*Su/Su*) і темних (+/+) плям на листках гетерозигот *Nicotiana tabacum*, так звані “*twin*”-плями [8, 9]. Достовірність результатів досліджень перевіряли за допомогою статистичного аналізу.

Результати досліджень та їх обговорення. Трьохмісячне спостереження динаміки росту *Nicotiana tabacum* на зразках ґрунтів з різних районів м. Івано-Франківська показало поступове збільшення висоти стебла з незначними коливаннями у кожному зразку. Найменші коливання цього показника спостерігалися у рослин, культивованих на зразках ґрунту з клумби на вул. Пулюя. Водночас у цих же рослин зареєстровано найповільніший ріст. При максимальній висоті стебла 50 мм середні значення інтенсивності росту були в 1,9 разів менші, ніж на контрольних зразках ґрунтів. Найкращий ріст *Nicotiana tabacum* виявлено на

зразках ґрунтів із зеленого господарства і скверу ІФНМУ (максимальна висота стебла 91 і 95 мм відповідно). Це може свідчити про насиченість ґрунтів мінеральними речовинами, які забезпечують активну експресію генів росту. Особливості підйому кривих росту *Nicotiana tabacum* на зразках ґрунтів з парку і скверу ІФНМУ подібні за його інтенсивністю. Остання була найвищою у період з 45 по 80 дні вегетації. Найстрімкіший підйом кривої росту *Nicotiana tabacum* на зразках ґрунту із зеленого господарства спостерігався у період з 88 по 118 дні. Крива, що характеризує динаміку росту *Nicotiana tabacum* на зразках ґрунтів з Пасічної, має дві ділянки різкого підйому: 48-64 та 100-125 дні вегетації і дуже подібна до таких на зразках ґрунтів з парку і скверу ІФНМУ до 64 дня вегетаційного періоду.

Дослідженнями діаметру крони *Nicotiana tabacum* на зразках ґрунтів з різних районів м. Івано-Франківська впродовж трьох місяців виявлено подібну тенденцію щодо його збільшення, як і попереднього показника. Між отриманими результатами динаміки росту стебла та крони встановлено сильні позитивні кореляції ($r > 0,9$, $p < 0,05$). Найменші коливання діаметру крони у рослин на зразках ґрунту з клумби по вул. Пулюя можуть бути пов'язані з низькою інтенсивністю їх росту (максимальний діаметр крони 119,5 мм). Підтвердженням вищесказаного є найкращий ріст *Nicotiana tabacum* на зразках ґрунтів із зеленого господарства і скверу ІФНМУ (відповідно максимальний діаметр крони 266 і 250 мм). Повільний ріст *Nicotiana tabacum* на зразках ґрунту з клумби на вул. Пулюя (в 2,2 рази менший, ніж у рослин на контрольних зразках ґрунтів) може бути зумовлений нестачею в них неорганічних речовин, необхідних для підтримання високої швидкості реалізації спадкової інформації [3, 4].

Закономірним продовженням досліджень було вивчення інтенсивності мутаційного фону ґрунтів за терміном, частотою та особливостями виникнення плям на листках *Nicotiana tabacum*. Найраніше плями +/+ з'явилися на листках *Nicotiana tabacum*, вирощених на зразках ґрунту з мікрорайону Пасічна (через $69,75 \pm 11,46$ днів після посадки), найпізніше плями виявлено на листках *Nicotiana tabacum*, вирощених на зразках ґрунтів з парку і зеленого господарства ($93,67 \pm 10,04$ і $95,33 \pm 4,67$ днів росту, відповідно). Проміжне положення займали терміни прояву мутацій гена *Su* на рослинах, культивованих у зразках ґрунту з клумби по вул. Пулюя ($85,00 \pm 22,00$ дні вегетації), причому останні відзначалися найбільшим діапазоном коливань у різних рослин.

Максимальний індекс (100%) рослин *Nicotiana tabacum* (*Su*+) з плямами зареєстровано при вирощуванні на зразках ґрунтів зеленого господарства і скверу ІФНМУ, мінімальний показник (40%) характерний для ґрунту з клумби вул. Пулюя (табл.). Проміжні величини цього індексу зафіксовано на зразках ґрунтів з Пасічної (80%) і парку (60%). Зростання індексу рослин з плямами на зразках ґрунтів зеленого госпо-

дарства і скверу ІФНМУ корелює з найбільшою інтенсивністю росту рослин на цих зразках ($r \geq 0,9$). Ймовірно, насиченість цих ґрунтів мінеральними добривами сприяє не лише активній експресії генів, але й збільшує частоту зворотних соматичних мутацій. Можна припустити, що у цих ґрунтах є фактори (хімічної чи фізичної природи), які блокують фенотипову реалізацію гена *Su* в деяких клітинах на певних етапах транскрипції, процесингу, трансляції та посттрансляційних змін, оскільки клітини *Nicotiana tabacum* еукаріотичні і характеризуються багатоступеневим і комбінативним механізмом регуляції експресії генетичної інформації [9].

Таблиця. Характеристика плям, які візуалізують мутації на листках *Nicotiana tabacum* (*Su/+*), вирощених на зразках ґрунтів з різних районів м. Івано-Франківська

Місце відбору ґрунтів	Кількість дослідних рослин	Індекс рослин з плямами, %	Кількість листків з плямами на рослину	Кількість плям на рослину	Площа плям на рослину, мм ²	Індекс інтенсивності мутацій, %
Пасічна	5	80	4,00±1,47	5,25±1,89	248,88±242,8	2,64±2,47
Сквер ІФНМУ	5	100	2,40±0,68	3,20±1,11	6,80±3,16	0,08±0,02
Парк ім. Шевченка	6	60	2,67±0,33	2,67±0,33	2,67±0,33	0,05±0,0
Клумба вул. Пулюя	5	40	2,00±0,0	3,00±0,0	3,25±0,25	0,22±0,04*
Зелене господарство	3	100	4,00±1,15	7,00±2,52	8,33±2,46	0,05±0,0

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

У ході експериментального моніторингу зафіксовано, що кількість листків з плямами на одну рослину найбільша у *Nicotiana tabacum*, вирощених на зразках ґрунтів Пасічної і зеленого господарства (4,00±1,47 і 4,00±1,13 відповідно). У рослин, культивованих на зразках ґрунту з клумби вул. Пулюя, цей показник удвічі менший. Проміжну кількість листків з плямами на рослину виявлено у *Nicotiana tabacum* із зразків ґрунтів скверу ІФНМУ та парку (2,40±0,68 і 2,67±0,33 відповідно). Наступний індекс активності мутаційного процесу (кількість плям на рослину) суттєво відрізнявся від попереднього. Його середні значення переважали у *Nicotiana tabacum*, вирощених на зразках ґрунту зеленого господарства (7,00±2,52), а на зразках ґрунту з парку були найнижчими (2,67±0,33). Площа плям на рослину була найбільшою у зразках ґрунтів Пасічної (248,88±242,8) і перевищувала таку у рослин, вирощених на зразках ґрунтів парку (2,67±0,33) і зеленого господарства (8,33±2,46), відповідно у 93,2 і 30 разів (див. табл.). Це може бути зумовлено наявні-

стю секторних плям зі значною площею у рослин, вирощених на зразках ґрунтів Пасічної (23,8% від загальної кількості плям), причому 80% з них зареєстровано на одній рослині. На рослинах, вирощених на ґрунті зі скверу ІФНМУ, зафіксовано 6,25% секторних плям площею 15 мм². На рослинах, які росли на зразках інших ґрунтів, плям-секторів +/+ (“dark green”) не відмічено (секторними прийнято вважати плями +/-, площа яких перевищує 2±1 мм²). Секторні плями значної площі виникають на ранніх етапах формування листка, їх помітно відразу, коли починає розвиватися молодий листочок. Особливий інтерес представляють у цьому контексті темно-зелені плями “fifty-fifty”, які займають півлистка. Такі плями спостерігалися тільки на рослинах, вирощених на зразках ґрунту з Пасічної (9,5% від загальної кількості плям +/-). На рослині, культивованій на зразках ґрунту із скверу ІФНМУ, ми спостерігали пляму “twin” загальною площею 2,5 мм². Це єдиний випадок візуалізації одночасної мутації обох алелей гена *Su* ($Su \rightarrow +$ з утворенням +/+ і $+ \rightarrow Su$ з утворенням *Su/Su*) серед усіх дослідних рослин даної вибірки.

Найвищий індекс інтенсивності мутацій (ІМ) – співвідношення площі плям і площі листків з плямами однієї рослини) зареєстровано у ґрунті з Пасічної (2 64±2,47%). Він переважав контрольні величини у 52,8 рази. У ґрунті зі скверу ІФНМУ ІМ був більшим в 1,6 рази, а в рослин, вирощених на зразках ґрунту клумби вул. Пулюя – у 4,4 рази порівняно з контролем. Оскільки показники ІМ рослин відображають кількість клітин, у яких відбулася зворотна мутація гена *Su* до дикого типу, їх можна вважати значущими для ідентифікації ступеня мутагенності дослідних ґрунтів.

Таким чином, проведені дослідження засвідчили, що забруднення ґрунту мутагенами призводить до сповільнення ростових процесів, тобто пригнічення експресії генів росту та розвитку рослинних організмів.

Ген *Sulfur* (*Su*) рослини *Nicotiana tabacum* схильний до зворотної мутації, тобто дикого типу +. Мутації $+ \rightarrow Su$ трапляються надзвичайно рідко (у нашому експерименті мутації такого типу не візуалізувалися). Частота одночасних мутацій обох алелей гетерозиготних рослини *Nicotiana tabacum* (*Su/+*) дуже низька. «Twin»-плями зафіксовано тільки на рослинах, вирощених на зразках ґрунту зі скверу ІФНМУ, що свідчить про хімічну забрудненість цієї території, зумовлену антропогенними чинниками.

Кореляція між усіма середніми фенотиповими показниками рослин, вирощених на ґрунтах різних районів міста (парк, сквер ІФНМУ, клумба по вул. Пулюя) і зеленого господарства, – висока ($r=0,9-1$, $p<0,01$), крім Пасічної. Показники рослин останньої корелювали достовірно тільки з такими зі скверу ІФНМУ ($r=0,74$ по Спірмену, $p<0,05$). Сильні позитивні взаємозв'язки встановлено між висотою стебла рослин і діаметром їх крони ($r=0,93$, $p<0,05$); висотою стебла рослин та індексом рослин з плямами ($r=0,96$, $p<0,01$); кількістю листків з плямами

та кількістю плям на рослину ($r=0,89$, $p<0,05$); індексом інтенсивності мутацій та площею плям на рослину ($r=1$, $p<0,01$). Між іншими показниками достовірних кореляцій (по Пірсону і по Спірмену) не виявлено.

Встановлено сильні позитивні кореляції між усіма показниками рослин, вирощених на зразках ґрунтів із дослідних районів м. Івано-Франківська і зеленого господарства ($r=0,96-1$, $p<0,01$). Виняток склала одна рослина з Пасічної, взаємозв'язки між показниками росту і чутливості до мутагенів якої були недостовірними, хоча і мали переважно середню силу. Це можна пояснити наявністю на листках не поодиноких дрібних, а секторних плям. Водночас у всіх рослин з мікрорайону Пасічної встановлено високі кореляції між кількістю плям на рослину і кількістю листків з плямами ($r=0,99$, $p<0,05$), індексом інтенсивності мутацій і площею плям ($r=1$, $p<0,01$). У рослин, вирощених на ґрунті зі скверу ІФМНУ, виявлено сильні позитивні взаємозв'язки між кількістю листків з плямами і кількістю плям на одну рослину ($r=0,96$, $p<0,01$). У рослин на ґрунті зеленого господарства сильні взаємозв'язки між кількістю листків з плямами і площею плям ($r=1$, $p<0,05$).

Висновки.

1. Результати проведених досліджень з пророщування гетерозиготних рослин *Nicotiana tabacum* на різних зразках ґрунтів м. Івано-Франківська засвідчили можливість їхнього використання для тестування інтенсивності мутагенного забруднення.

2. Доведено, що зразки хімічно забрудненого ґрунту з клумби по вул. Пулюя сповільнюють ріст стебла *Nicotiana tabacum* в 1,9 рази, а ріст крони – в 2,2 рази порівняно з контролем.

3. За показниками мутаційного процесу в гетерозигот *Nicotiana tabacum* встановлено найвищу забрудненість мутагенними чинниками у зразках ґрунтів з мікрорайону Пасічна, найнижчу – в ґрунті з парку міста Івано-Франківська (умовно екологічно чиста територія).

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні молекулярно-генетичних механізмів експресії гена *Su* рослин *Nicotiana tabacum* при пророщуванні на ґрунтах Івано-Франківської області з різною інтенсивністю забруднення.

Література

1. Адаменко О.М. Регіональна екологія і природні ресурси (на прикладі Івано-Франківської області) / О.Адаменко, М.Приходько. – Івано-Франківськ, 2000. – 278 с.
2. Агрохімічний та агроекологічний стан ґрунтів Івано-Франківської області: Довідник – Івано-Франківськ, 2005. – 78с.
3. Алехина Н.Д. Физиология растений / Н.Д.Алехина, Ю.В.Балнокин, В.Ф.Гавриленко [и др.]. – М.: Академия, 2005. – 754 с.
4. Кузнецов В.В. Физиология растений / В.В.Кузнецов, Г.Д.Дмитриева. – М.: Высшая школа, 2005. – 736 с.

5. Меженский В.Н. Растения-индикаторы. – М.: АСТ; Донецк: Сталкер, 2004 – 80 с.
6. Моніторинг довкілля: підручник / [В.М.Боголюбов, М.О.Клименко, В.Б.Мокін та ін.]; під ред. В.М.Боголюбова [2-е вид., перероб. і доп.]. – Вінниця: ВНТУ, 2010. – 232 с.
7. Kovalchuk I. Transgenic Plants as Sensors of Environmental Pollution Genotoxicity / I.Kovalchuk and O.Kovalchuk // Sensors. – 2008. – Vol.8. – P. 1539-1558.
8. Ma T.H. Genotoxic agent detected by plant bioassays / T.H.Ma, G.L.Cabrera and E.Owens // Rev. Environ. Health. – 2005. – Vol.20. – P. 1-13.
9. Jastrebova O. Analysis of Soil Genotoxicity in the City of Ivano-Frankivsk Using *Nicotiana Tabacum Su/+* Plants / O.Jastrebova, I.Kovalchuk, L.Kovalchuk // Advances in bioresearch. – 2010. – Vol. 1(I). – P. 199-204.

MOLECULAR GENETIC EFFECTS OF SOIL IVANO-FRANKIVSK, DTTERMINED USING THE HETEROZYGOUS PLANTS NICOTIANA TABACUM SU / +

Larysa Kovalchuk¹, Olga Yastrebova¹, Igor Kovalchuk²

¹*Department of Medical Biology and Medical Genetics; Ivano-Frankivsk National Medical University; 76018, Ivano-Frankivs'k, Galytska str., 2;*

²*Department of Biological Sciences, University of Lethbridge; Lethbridge, AB, Canada*

*Modern methods of indicating the degree of mutagenic pollution based on the use of molecular genetic changes in transgenic plants germinated on samples of different soils. We analyzed the phenotype of heterozygous mutations manifestations plant *Nicotiana tabacum Su / +*, which displays different types of spots on the leaves, depending on the intensity of soil contamination. The appearance of spots on the leaves are the result of DNA damage in the locus *Su*. Plants grown in soils taken from five different districts of the city of Ivano-Frankivsk. Fields marked as clean: garden Taras Shevchenko and green economy (respectively plot №№ 1 and 2) and contaminated: microregion Pasichna, st. Pul'uj and park near "Ivano-Frankivsk National Medical University" (respectively sections №№ 3, 4 and 5). Installates the highest number and total area of the spots in the plants on the plot number 3. Analysis of mutation's intensity index (IMI), which reflects the percentage of leaf area occupied by spots was low in plants grown on soil plot №№ 1 and 2, and the highest in plants from plots №№ 3, 4 and 5.*

Key word: *heterozygous plants *Nicotiana tabacum Su / +*, the frequency of mutations, the intensity of soil contamination*