



Биол. журн. Армении, 1 (68), 2016

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ПОЧВ СЮНИКСКОГО МАРЗА АРМЕНИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МОДЕЛЬНОГО ТЕСТ-ОБЪЕКТА КЛОНА 02 ТРАДЕСКАНЦИИ В СИСТЕМЕ ПОЧВА-РАСТЕНИЕ

Р.Э. АВАЛЯН¹, Э.А. АГАДЖАНЫН¹, А.Л. АТОЯНЦ¹,
А.Л. ГЕВОРКЯН², А.Э. СИМОНЯН¹

¹Ереванский госуниверситет, кафедра генетики и цитологии,
²Лаборатория общей и молекулярной генетики НИИ “Биология”
genetik@ysu.am; a.atoyants@rambler.ru

Исследован уровень генотоксичности почвенных образцов с территории Сюникского марза Армении с применением тестов Трад-ВТН и Трад-МЯ модельного тест-объекта клон 02 традесканции. Установлен высокий уровень генетических эффектов по данным обоих биотестов в почвенных вариантах N1 и N5 по сравнению с контролем и другими вариантами. Выявлена прямая зависимость между частотой маркерных критериев теста Трад-ВТН и теста Трад-МЯ.

Полученные результаты показывают, что тест-система традесканция (клон 02) может быть использована в качестве надежного биоиндикатора генетического мониторинга загрязнения почвы техногенно нарушенных территорий.

*Традесканция (клон 02) – генетические эффекты – система почва-растение
– загрязнение почвы*

Ուսումնասիրվել է Սյունիքի մարզի տարածքների հողային նմուշների գենոթունա-բանական մակարդակը տրադեսկանցիայի (02 կլոն) անդաթելերի մագիկների և միկրո-կորիզների թեստ համակարգերի կիրառմամբ: Հաստատվել է գենետիկական էֆեկտների բարձր մակարդակ N1 և N5 հողային տարբերակներում համեմատած ստուգիչի և մյուս տարբերակների հետ: Հայտնաբերվել է ուղղակի կախվածություն կիրառված երկու թեստերի մարկերային չափանիշների հաճախականության միջև:

Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ տրադեսկանցիան (02 կլոն) կարող է կիրառվել որպես հուսալի կենսաինդիկատոր տեխնածին տարածքներից վերցված հողերի գենետիկական մշտադիտարկման համար:

*Տրադեսկանցիա (02 կլոն) – գենետիկական էֆեկտներ –
հող-բույս համակարգ – հողի աղտոտում*

The genotoxicity level of soil samples from areas of Syunik Marz with application Trad-SH and Trad-MN bioassays of model test-object Tradescantia (clone 02) was investigated. The higher level of genetic effects on the both biotests data in the N1 and N5 soil variants was revealed as compared to the control and other studied samples. The positive correlation between marker criterions frequency of Trad-SN and Trad-MN tests was disclosed.

The obtained results show that Tradescantia (clone 02) test system can be applied as efficient bioindicator in genetic monitoring of technogenic territories soil pollution.

Tradescantia (clone 02) – genetic effects – soil-plant test system – soil pollution

Почва является наиболее чувствительным индикатором эколого-геохимической обстановки территорий, так как в ней пересекаются пути миграции многих химических элементов, в том числе и токсикантов. Мониторинг загрязнения почвы техногенных и природных территорий является важнейшей частью системы экотоксикологического тестирования состояния окружающей среды [1, 3]. Для оценки антропогенного и техногенного воздействия на природные территории весьма актуально использование высокоинформативных растительных тест-систем [7,8]. В системе генетического мониторинга традесканция (клон 02) используется как чувствительный биоиндикатор уровня генотоксичности и кластогенности загрязнителей воздушной, водной и почвенной среды. Данная тест-система применяется для оценки воздействия ксенобиотиков окружающей среды не только на соматические, но и на спорогенные клетки в период микроспорогенеза.

Целью настоящей работы явилась оценка уровня генотоксичности некоторых почвенных образцов с территории Сюникского марза (окрестности г.Капан и прилегающих территорий) с применением тест-системы волосков тычиночных нитей (тест Трад-ВТН) и микроядерного теста (тест Трад-МЯ) традесканции (клон 02).

Материал и методика. Материалом исследования служили почвенные образцы с территории Сюникского марза Армении, расположенной в окрестностях г.Капан. На изучаемой территории, где в основном преобладают горно-лесные, горно-коричневые вязко-торфяные почвы, находятся Капанские медные, медно-молибденовые и Шаумянские полиметаллические рудники. На этой территории находятся небольшие рудники известняка, базальта, каолинита и пласты залежей гипса и ангидрида [2].

В качестве объекта изучения в системе “почва-растение” использовали клон 02 традесканции, растения которого выращивались в вазонах с исследуемыми почвенными образцами в одинаковых условиях. Для проведения вегетационного эксперимента исследуемые образцы почвы были соответственно маркированы: N1 – Отвал-1, N2 – Отвал-2, N3 – Водохранилище, N4 – Пионерская дамба, N5 – район с.Шаумян, N6 – вблизи с. Зангелан (берег р. Вохчи), N7 – вблизи с. Цав (Шикахохский заповедник).

В качестве условно контрольных использовали почвенные образцы со стеллажей теплицы ЕГУ. Условно фоновыми служили образцы с территории Шикахохского заповедника. Был проведен химический анализ исследуемых проб почвы на содержание химических элементов и тяжелых металлов (Na, P, K, Ca, Mg, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Ag, Mo, Cd, Pb).

Для определения уровня генотоксичности исследуемых образцов почвы использовали тест-систему волосков тычиночных нитей традесканции (биотест Трад-ВТН), где в качестве маркерных тест-критериев учитывались изменения окраски клеток-волосков тычиночных нитей с голубых на розовые (рецессивные мутационные события (МС) – РМС), а также появление генетически неопределенных бесцветных МС– БМС. При тестировании также фиксировались морфологические изменения волосков – карликовые (невыжившие – НВ) и разветвленные (РВ). В каждом варианте было проанализировано 10–22 тыс. ВТН в зависимости от почвенного образца. Расчеты частоты мутационных событий проводили в среднем на 1000 волосков по общепринятой методике [5].

Для определения кластогенных эффектов с применением микроядерного теста учитывались два основных тест-критерия: частота образования микроядер и процент тетрад с микроядрами. В каждом варианте было просмотрено по 3000 тетрад. Рассчитывали процент микроядер на 100 тетрад по общепринятой методике [6].

Уровень накопления химических элементов в изучаемых почвенных образцах определяли методом сопоставления фактических валовых содержаний металлов с условно контрольным (или фоновым) содержанием. При этом рассчитываемый суммарный коэффициент концентрации (СПК) является количественным интегральным показателем общей техногенной нагрузки и уровня содержания тяжелых металлов (ТМ) и химических элементов в исследуемой почвенной среде, а также – одним из критериев техногенной аномальности изучаемой территории [4].

Для выявления уровня техногенного загрязнения исследуемых почвенных образцов были построены качественные геохимические ряды по всем изученным вариантам со средним содержанием в них исследуемых

химических элементов и тяжелых металлов путем нормирования элементов в изученных образцах по условно контрольному значению. При этом был рассчитан коэффициент техногенной концентрации ($K_c = C/C_k$, где C – содержание элемента в среде, C_k – условно контрольное содержание), а также суммарный показатель концентрации для каждого варианта – сумма нормированных по условному контролю содержаний химических элементов в исследуемой почвенной пробе.

Все полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента и применением компьютерной программы Statgraphics 16.2 Centurion.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты по учету соматических мутаций у традесканции на основании данных биотеста Трад-ВТН выявили достоверное повышение частоты как РМС, так и БМС во всех исследуемых вариантах по сравнению с условно контрольным вариантом. Максимальный выход РМС, превышающий контрольный уровень в 3 раза, наблюдался в почвенных образцах N1 и N5. Также был отмечен значительный уровень БМС в вариантах N1, N2 и N3, который превысил контроль в 2,5–7,5 раз соответственно (рис.1).

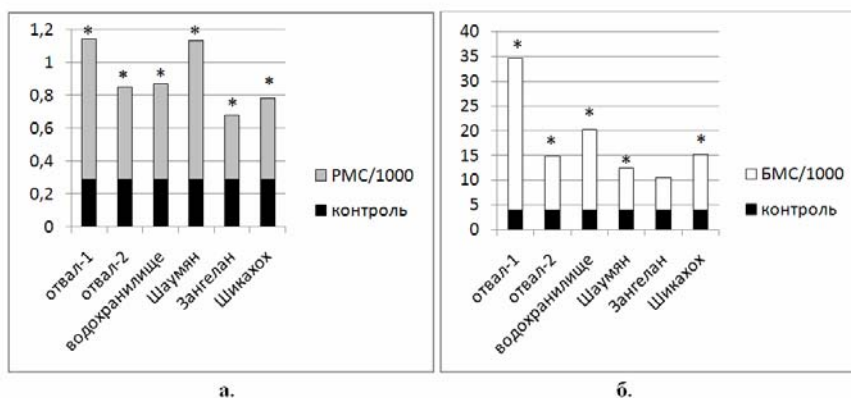


Рис. 1. Частота розовых (РМС)– (а) и бесцветных (БМС)– (б) мутационных событий в соматических клетках традесканции

Кроме этого, во всех исследуемых вариантах наблюдался высокий процент разветвленных и невыживших волосков, что свидетельствует о тератогенном действии находящихся в почвенных образцах элементов на традесканцию. Наибольший эффект, превышающий контроль в 2–2,5 раза, по данным морфологическим нарушениям, наблюдался в вариантах N5 и N6. Следует также отметить, что в начале вегетации растения образца N4 высохли, что может быть обусловлено соотношением в данной пробе токсичных для роста растения химических элементов.

Кроме того, в течение всей вегетации происходило подавление роста и цветения растений в варианте с образцом N2, где был определен наиболее высокий уровень СПК по сравнению с другими вариантами.

Изучение кластогенных эффектов на основании биотеста Трад-МЯ показало повышение частоты образования как МЯ в тетрадах, так и тетрад с МЯ во всех изученных почвенных пробах по сравнению с контролем. Максимальный уровень индукции был выявлен в образцах N1, N5 и N6, где значения обоих маркерных тест-критериев превысили уровень контроля в 2–2,5 раз в зависимости от варианта (рис. 2).

На основании построенных качественных геохимических рядов были выделены доминантные загрязнители в каждом почвенном образце, а также определена доля каждого химического элемента и ТМ в общей сумме загрязнения (табл. 1).

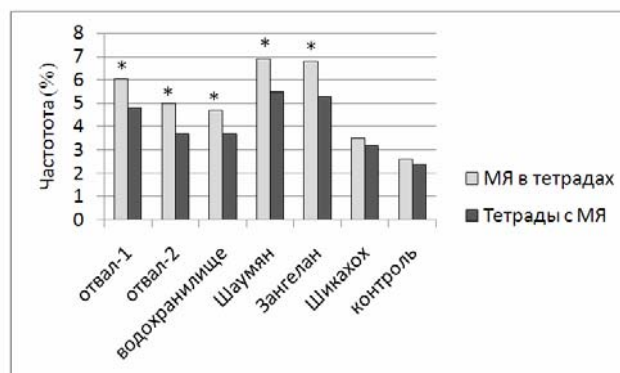


Рис. 2. Частота розовых микроядер (МЯ) в тетрадах и тетрад с МЯ в спорогенных клетках традесканции

Таблица 1. Геохимические ряды и суммарный показатель концентрации химических элементов в исследуемых почвенных образцах

Пробы почв	Геохимический ряд *	СПК
N1	$\text{Mo}_{(5,0)} - \text{Cu}_{(7,7)} - \text{Cd}_{(6,5)} - \text{Zn}_{(2,4)} - \text{Ag}_{(1,4)} - \text{Fe}_{(0,9)} - \text{K}_{(0,8)} - \text{Mn}_{(0,4)} - \text{Cr}_{(0,3)} - \text{Mg}_{(0,2)} - \text{Ca}_{(0,1)}$	47,1
N2	$\text{Cd}_{(30,0)} - \text{Zn}_{(28,0)} - \text{Mg}_{(18,2)} - \text{Cu}_{(12,2)} - \text{Ag}_{(8,0)} - \text{Ca}_{(4,9)} - \text{Fe}_{(3,7)} - \text{K}_{(2,9)} - \text{Mn}_{(2,7)} - \text{Mo}_{(2,0)} - \text{P}_{(1,0)} - \text{Cr}_{(0,4)}$	114,0
N3	$\text{Cu}_{(1,7)} - \text{Ca}_{(1,3)} - \text{Mo}_{(0,9)} - \text{Fe}_{(0,8)} - \text{Mn}_{(0,8)} - \text{Mg}_{(0,7)} - \text{K}_{(0,6)} - \text{Ag}_{(0,4)} - \text{Cr}_{(0,2)}$	9,8
N4	$\text{Cu}_{(20,5)} - \text{Cd}_{(16,6)} - \text{Ag}_{(8,0)} - \text{Zn}_{(6,7)} - \text{Mo}_{(2,0)} - \text{Fe}_{(1,6)} - \text{K}_{(0,8)} - \text{Mn}_{(0,5)} - \text{P}_{(0,4)} - \text{Cr}_{(0,3)} - \text{Mg}_{(0,2)} - \text{Ca}_{(0,1)}$	57,7
N5	$\text{Cd}_{(6,5)} - \text{Zn}_{(3,3)} - \text{Ca}_{(4,0)} - \text{P}_{(3,4)} - \text{Cu}_{(3,0)} - \text{Mo}_{(2,0)} - \text{K}_{(1,9)} - \text{Mg}_{(1,8)} - \text{Ag}_{(1,6)} - \text{Fe}_{(1,0)} - \text{Mn}_{(0,9)} - \text{Cr}_{(0,7)}$	32,1
N6	$\text{Mo}_{(20,0)} - \text{Cu}_{(11,7)} - \text{Cd}_{(2,6)} - \text{Zn}_{(2,1)} - \text{Ag}_{(2,0)} - \text{P}_{(1,9)} - \text{K}_{(1,6)} - \text{Fe}_{(1,3)} - \text{Cr}_{(0,3)} - \text{Mn}_{(0,1)} - \text{Ca}_{(0,04)} - \text{Mg}_{(0,04)}$	43,7
N7	$\text{P}_{(1,6)} - \text{Fe}_{(1,3)} - \text{Mg}_{(0,9)} - \text{Ca}_{(0,9)} - \text{Ag}_{(0,8)} - \text{Mn}_{(0,7)} - \text{K}_{(0,7)} - \text{Cd}_{(0,6)} - \text{Zn}_{(0,6)} - \text{Cr}_{(0,6)} - \text{Cu}_{(0,5)}$	9,8

*Примечание: в скобках приведено значение коэффициента техногенной концентрации по отношению к контролю

Был проведен корреляционный анализ между уровнем соматических мутаций (РМС), а также процентом МЯ и концентрациями химических элементов и тяжелых металлов в исследуемых почвенных образцах. На основании полученных данных выявлена положительная, но недостоверная корреляция между концентрациями Cu, Mo и P в почвенных образцах и обоими тест-критериями микроядерного теста (табл. 2).

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между концентрациями химических элементов и значениями критериев микроядерного теста

Параметры Элементы	МЯ в тетрадах	Тетрады с МЯ
Медь (Cu)	$0,55 \pm 0,36$	$0,48 \pm 0,40$
Молибден (Mo)	$0,56 \pm 0,37$	$0,59 \pm 0,36$
Фосфор (P)	$0,59 \pm 0,35$	$0,70 \pm 0,32$

Проведенный корреляционный анализ между уровнями мутационных событий (РМС, БМС, НВ, РВ) и частотой обоих тест-критериев микроядерного теста показал наличие достоверной положительной связи между РМС и БМС ($r = 0,67$, при $p < 0,05$), а также – между РМС и частотой МЯ в тетрадах и тетрад с МЯ ($r = 0,61$ и $0,62$ соответственно, при $p < 0,05$). Кроме того, выявлена

положительная прямая зависимость между значениями НВ и РВ ($r = 0,82$, при $p < 0,01$), а также – между частотой МЯ в тетрадах и данными параметрами (для НВ – $r = 0,72$, при $p < 0,01$, а для РВ – $r = 0,70$, при $p < 0,01$).

Полученные нами данные по изучению генотоксичности исследуемых почвенных образцов с территории Сюникского марза с применением обоих биотестов показали увеличение как частоты РМС, так и МЯ в тетрадах во всех опытных вариантах по сравнению с контрольным уровнем в зависимости от пункта исследования. Наибольший выход генетических эффектов по данным обоих тестов проявился в вариантах N1 и N5, что свидетельствует о выраженной генотоксичности данных почвенных образцов. Кроме того, данными корреляционного анализа показана прямая зависимость между уровнем проявления маркерных критериев теста Трад-ВТН (РМС, НВ и РВ) и критериями Трад-МЯ теста.

На основании проведенных нами исследований показана целесообразность и возможность применения модельной системы традесканции (клон 02) для биоиндикации и генетического мониторинга состояния почвы техногенно нарушенных и природных территорий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Водяницкий Ю.Н.* Экоотоксикологическая оценка опасности тяжелых металлов и металлоидов в почве. *Агрохимия*, 2, с. 75-84., 2012.
2. *Оганесян В.К.* Кафанские медные рудники. Ереван, 158с., 1973.
3. *Орлов Д.С., Малинина М.С., Мотузова Г.В.* Химическое загрязнение почв и их охрана, М., Агропромиздат, 303с., 1991.
4. *Перельман А.И., Касимов Н.С.* Геохимия ландшафта. М., Астрель, 768с., 1999.
5. *Ma T.H., Gabrera G.L., Cebulka-Wasilewska A., Chen R., Loarea E., Vanderberg A.L., Salamone M.F.* Tradescantia stamen hair mutation bioassay. *Mutat. Res.*, 310, p. 211-220, 1994a.
6. *Ma T.H., Gabrera G.L., Chen R., Gill B.S., Sandhu S.S., Vanderberg A.L., Salamone M.F.* Tradescantia Micronucleus Bioassay. *Mutat. Res.*, 310, p.220-230, 1994b.
7. *Cesniene T., Kleizaite V., Ursache R., Zvingila D., Radrevicius A., Patamsyte J., Rancelis V.* Soil-surface genotoxicity of military and urban territories in Lithuania, as revealed by Tradescantia bioassays. *Mutat. Res.*, 697, p.10-18, 2010.
8. *Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C., Echer S., Ma T.H., Horaka S., Kundi M., Knasmuller S.* Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 2, p.183-191, 1998.

Поступила 03.12.2015