

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ ДРОЗОФИЛЫ К БЕНЗОТРИАЗОЛУ

© 2006 Е.С. Селезнева

Самарский государственный университет

Исследованы механизмы адаптации дрозофилы к воздействию полулетальными дозами бензотриазола. Обнаружено, что бензотриазол индуцирует доминантные и рецессивные летальные мутации как в нетоксичной дозе (0,1 мг/мл), так и в дозе LD50. При постоянном воздействии бензотриазолом в дозе LD50 в течение 5 поколений наблюдалось достоверное снижение смертности на всех стадиях онтогенеза и восстановление плодовитости. Эксперименты по длительной и кратковременной преадаптации нетоксичной дозой к последующему мутагенному действию дозой LD50 выявили различия в мутагенном ответе у различных полов дрозофилы. Показано, что возникновение адаптации к исследованному ксенобиотику, связано с селекцией организмов по высоко активным генам резистентности в период гаметогенеза.

Засорение окружающей среды генотоксическими соединениями приводит к изменению состава экосистем. Это связано с двумя параллельно идущими процессами: вымиранием чувствительных к данному токсиканту организмов и отбором высоко адаптивных форм к данному ксенобиотику. Оба эти процесса относятся к организмам как внутри каждого вида, так и к различным видам. Результатом этого является обеднение экосистем и усиление их неустойчивости к действию антропогенных факторов.

Гибель от воздействия токсиканта может происходить разными путями:

- гибель молодежи;
- снижение иммунитета;
- нарушение процессов роста;
- изменение поведения;
- нарушение полового созревания и как следствие последнего рост абортюв, рождение нежизнеспособных детей, аномалии полового поведения и т.п.

Селекция на устойчивость к какому-либо токсиканту приводит к резкому снижению генетического разнообразия, вследствие повышения частоты гомозигот по аллелям устойчивости. А между тем устойчивость к токсикантам не гарантирует высокой плодовитости. Было показано, что особи устойчивые к ядохимикатам имеют худшие темпы роста, меньшую плодовитость и меньшую продолжительность жизни [12].

Особую тревогу вызывают соединения, хронически воздействующие на живые организмы вследствие их широкого использования в хозяйственной деятельности и в связи с этим с постоянным поступлением в окружающую среду. К такому роду ксенобиотикам относится бензотриазол, который используется в фотографии, шинной промышленности, как антикоррозийное средство и входит в состав многих комплексных гербицидов [2].

Ранее была показана высокая токсичность бензотриазола как для млекопитающих, так и для некоторых членистоногих. Так вдыхание паров бензотриазола приводило у крыс к поражению центральной нервной системы, печени, органов кроветворения, а при поступлении бензотриазола перорально с водой и пищей вызывало развитие различных злокачественных опухолей [5, 10]. Для дрозофилы была доказана мутагенность бензотриазола [4].

Поэтому интересно проанализировать в модельных экспериментах возможность адаптации к такому соединению, которое помимо токсичности, способно индуцировать мутации. Целью данного исследования явился анализ способности *Drosophila melanogaster* адаптироваться к воздействию на нее бензотриазолом.

Материал и методы исследования

Объектом исследования служили 3-4 дневные имаго дикой линии Canton-S

Drosophila melanogaster. Бензотриазол использовали в виде водных растворов двух концентраций: 0,01 мг/мл – нетоксичная для имаго дрозофилы доза, 8,66 мг/мл – LD50 для самок и 6,64 мг/мл – LD50 для самцов. Время воздействия – 1 сутки.

Способность бензотриазола индуцировать доминантные летальные мутации определяли по методу Белоконь [3].

При анализе воздействия бензотриазола на самок использовали 900 девственных самок, которых предварительно в течение суток затравливали бензотриазолом в дозе LD50 и в течение суток скрещивали с 500 интактными самцами. В течение 10 часов производили сбор яиц, помещая в популяционный ящик для скрещивания, через каждые два часа чашки Петри со стандартным кормом [9]. Подсчитывали, число отложенных яиц и число вылупившихся личинок. Выживших личинок отбирали и помещали в сахарные стаканчики для анализа числа куколок и числа имаго.

При анализе способности бензотриазола индуцировать доминантные летальные мутации у самцов, затравливали 900 самцов, выживших – затем скрещивали с 500 интактными самками, и затем анализировали, как описано выше эмбриональную, личиночную гибель и гибель на стадии куколок.

Вылетевших имаго первого поколения (F1) опять подвергали воздействию бензотриазола в дозе LD50, после чего анализировали число отложенных яиц, эмбриональную, личиночную гибель, а также гибель в процессе метаморфоза на стадии куколки по методике, описанной выше. Затем подсчитывали число доминантных леталей [3]. Таким образом, было проанализировано 4 поколения. С помощью однофакторного дисперсионного анализа [7] выясняли достоверность отличий в плодовитости, эмбриональной, личиночной и куколочной гибели, числом доминантных леталей, между поколениями и контролем.

Для анализа способности дрозофилы адаптироваться к генотоксичности бензотриазола были проведены две серии экспериментов.

1 серия.

Интактных самок и самцов рассаживали в сахарные стаканчики, где в стандартный

корм был добавлен бензотриазол в таком количестве, что его концентрация составила 0,01 мг/мл. Таким образом, с откладки яиц и до вылета имаго *Drosophila* проводила свою жизнь в контакте с бензотриазолом. Вылетевших имаго (отдельно девственных самок и девственных самцов) в течение суток подвергали воздействию бензотриазола в дозе LD50 и затем по описанной выше методике анализировали плодовитость эмбриональную, личиночную и куколочную гибель и число доминантных леталей.

2 серия.

Интактных и девственных самок и самцов отдельно подвергали в течение суток воздействию бензотриазолом в концентрации 0,01 мг/мл. Через сутки имаго вторично подвергали воздействию бензотриазола но в дозе LD50. Затем анализировали плодовитость, гибель на разных стадиях онтогенеза и число индуцированных доминантных леталей.

Способность бензотриазола индуцировать рецессивные летальные мутации в X-хромосоме самцов оценивали с помощью стандартного метода Меллер-5 [8].

Достоверность различий между опытом и контролем оценивали с помощью критерия Стьюдента, однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализов [7].

Результаты и их обсуждение

Результаты анализа способности бензотриазола индуцировать доминантные летальные мутации у имаго дрозофилы в максимально нетоксичной дозе (0,01 мг/мл) и в дозе LD50 представлен в табл. 1.

Как видно из представленных результатов бензотриазол даже в нетоксичной дозе индуцировал достоверно различное число доминантных леталей у самок и самцов ($p < 0,01$). Различия в чувствительности к мутагенному действию у самок и самцов, как в нетоксичной дозе, так и в дозе LD50 определяется тем, что на стадии имаго половые клетки у разных полов находятся на разных стадиях развития: у самцов – это зрелые сперматозоиды, а у самок – ооциты [6].

Проведенные эксперименты показали, что бензотриазол способен индуцировать не

Таблица 1. Индукция бензотриазолом доминантных летальных мутаций

Концентрации	Процент доминантных летальных мутаций у	
	самок	самцов
0	1,5 ± 0,09	1,1 ± 0,6
0,01 мг/мл	13,2 ± 0,03	7,7 ± 0,07
доза LD50	24,2 ± 0,3	12,3 ± 0,5

Таблица 2. Индукция бензотриазолом рецессивных леталей у самцов дрозофилы

Концентрации бензотриазола	Процент рецессивных леталей
0	0,01 ± 0,01
0,01 мг/мл	0,16 ± 0,28
LD50	4,91 ± 0,3

только доминантные, но рецессивные летали (табл. 2).

Из полученных результатов видно, что бензотриазол проявляет мутагенную активность как в дозе LD50, так и в нетоксичной дозе и, следовательно, это должно так или иначе отражаться на способности дрозофилы адаптироваться к данному веществу.

Чтобы определить способность дрозофилы адаптироваться к воздействию бензотриазола, мы подвергали кратковременному (суточному) воздействию имаго самок и самцов в течение 5 поколений.

Девственные 5-дневные самки и самцы (по 1500 особей) по отдельности контактировали с бензотриазолом в дозе LD50, нанесенным на желатину. Затем выживших скрещивали между собой для получения следующего поколения. Из следующего поколения

отбирали девственных самок и самцов и когда они достигали возраста 5 дней, их подвергали воздействию бензотриазола в дозе LD50 и так до F5. Результаты эксперимента представлены на рис. 1

Из представленных результатов видно, что, начиная со второго поколения (F2), наблюдается достоверное снижение ($p < 0,01$) смертности. В F5 бензотриазол в дозе LD50, рассчитанной для F1, вызывает только 3-5% гибель имаго, достоверно не отличающуюся от контроля.

Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ показал, достоверное ($p < 0,01$) снижение смертности в ряду поколений и достоверное различие в смертности между полами после воздействия исследуемым соединением.

Основными составляющими состояния

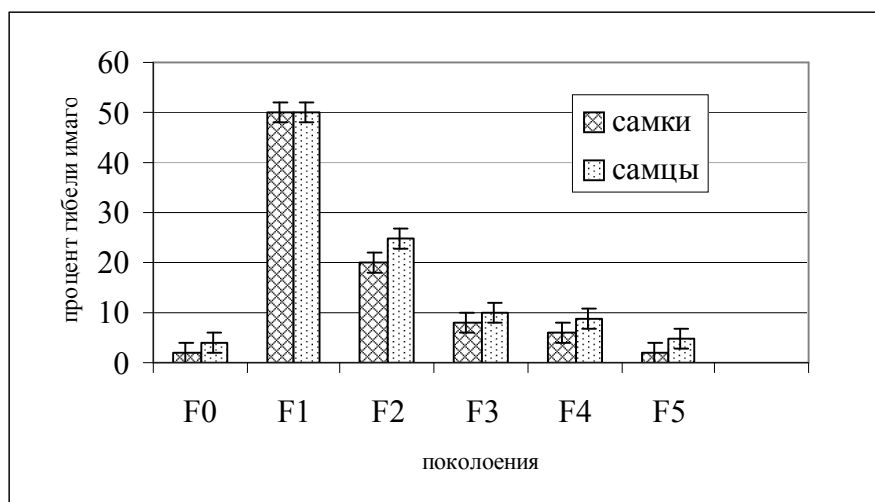


Рис. 1. Гибель имаго дрозофилы в ряду поколений при действии на них бензотриазолом в дозе LD50

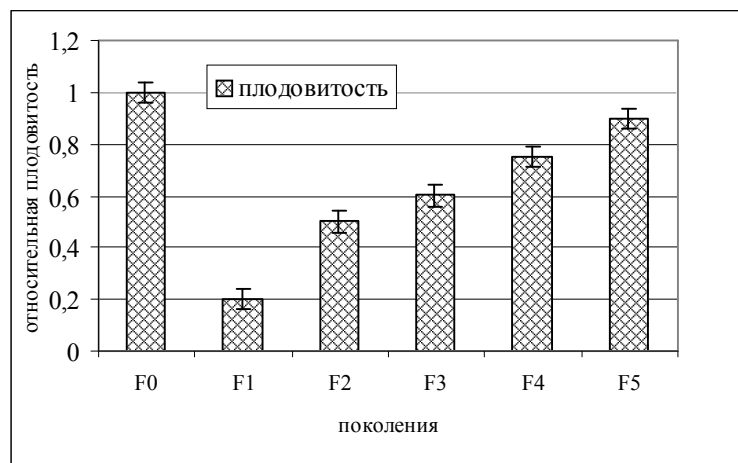


Рис. 2. Изменение плодовитости в ряду поколений подвергшихся кратковременному воздействию бензотриазола в дозе LD50

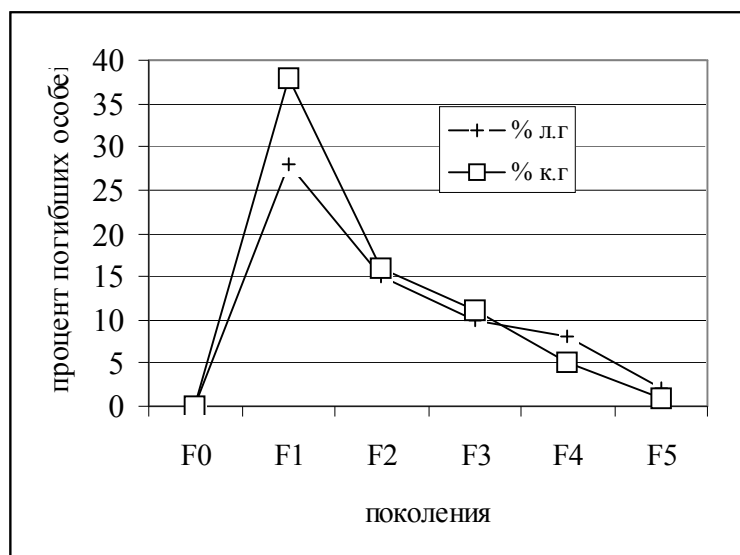


Рис. 3. Изменение личиночной гибели (% л.г.) и гибели на стадии метаморфоза (% к.г.) при кратковременном воздействии бензотриазолом в каждом поколении в дозе LD50

адаптированности являются не только выживаемость, но плодовитость [1]. Для оценки плодовитости мы воспользовались величиной относительной плодовитости, для чего плодовитость каждого поколения делили на плодовитость F0 (контроль).

Самая низкая плодовитость наблюдается в F1, при первом воздействии исследуемым ксенобиотиком в дозе LD50 (рис. 2). Затем в следующих поколениях наблюдался достоверный рост плодовитости ($p < 0,001$), тем не менее, даже в пятом поколении плодовитость была достоверно ниже, чем в контроле. Анализ суммарной гибели в личиночный период жизни и в период метаморфоза представлен на рис. 3.

Итак, в F1 после воздействия на имаго токсикантом в дозе LD50 наблюдалась гибель их потомства, как на личиночной стадии, так и на стадии куколки. В следующих поколениях, по-видимому, появились особи адаптированные к бензотриазолу, что выражается в снижении гибели, как личинок, так и куколок. Проведенный однофакторный дисперсионный анализ показал, что из поколения в поколение растет выживаемость на всех стадиях онтогенеза ($p < 0,001$).

Существует два возможных механизма возникновения адаптаций такого рода: 1) возникновение мутантов, устойчивых к действию бензотриазола, а в дальнейшем накопление их числа селективным воздействием

Таблица 3. Способность бензотриазола индуцировать доминантные и рецессивные летальные мутации

Способ воздействия	Процент доминантных леталей		Процент рецессивных леталей
	у самок	у самцов	у самцов
Воздействие на имаго, онтогенез которых прошел на среде с бензотриазолом (0,01 мг/мл) дозой LD50	3,4	5,8	0,12
Воздействие на имаго преадаптированных в течение суток бензотриазолом (0,01 мг/мл) дозой LD50	9	12,4	4,6

бензотриазола в следующих поколениях, 2) селекция уже существующих адаптантов, у которых быстро активируются гены резистентности, среди имаго *Drosophila melanogaster* дикой линии Canton-S.

Для проверки этих возможных путей возникновения адаптаций были проведены эксперименты по преадаптации к токсиканту его нетоксичными дозами. В первой серии экспериментов интактные имаго откладывали яйца в течение суток на корм, в состав которого входил бензотриазол в дозе 0,01 мг/мл. Вылетевших имаго тестировали на устойчивость к генотоксичности бензотриазола в дозе LD50, то есть определяли число возникших рецессивных и доминантных летальных мутаций. Во второй серии экспериментов интактные имаго в течение суток получали апельсиновый сок с растворенным в нем бензотриазолом в дозе 0,001 мг/мл, через сутки этих имаго обрабатывали бензотриазолом в дозе LD50, а затем подсчитывали число индуцированных доминантных и рецессивных леталей. Результаты суммированы в табл. 3.

Первая серия экспериментов показала, что при длительном воздействии ксенобиотика в нетоксичной дозе достоверно снижается мутагенное действие ($p < 0,01$) его в дозе LD50 (табл. 1,2). То есть можно говорить об активации генетических механизмов скрытой резистентности [11]. Так, для других насекомых было показано, что постоянное действие пестицидами приводит к селекции генов резистентности и за короткое время популяция насыщается ими [13]. Мы также это отмечаем, обнаружив рост плодовитости из поколения в поколение при разовом воздействии

бензотриазолом в каждом поколении. Проведенная серия экспериментов ничего не говорила о механизмах преадаптации, так как мы не могли отвернуть гипотезу о возникновении мутантов устойчивых к бензотриазолу.

Во второй серии экспериментов, когда преадаптация была проведена кратковременным воздействием (суточное воздействие на имаго), обнаружили, что уменьшение процента доминантных леталей наблюдалась только у самок. Интересно отметить, что частота возникновения как доминантных, так и рецессивных летальных мутаций у самцов не отличалась в этом эксперименте от такового при однократном воздействии бензотриазола в дозе LD50 (табл. 1, 2).

Различие в реакции особей женского и мужского пола связано с особенностями созревания половых продуктов. Так, воздействие малыми дозами на самок дрозофилы, у которых половые продукты – ооциты I порядка, активирует систему генов резистентности, в результате чего часть поврежденных хромосом направляется в полярные тельца. У самцов половые продукты представлены зрелыми сперматозоидами [6]. Гены резистентности не работают, результатом этого является отсутствие преадаптации; проверить последнее предположение возможно только в случае использования азолов, не являющихся агонистами пуринов, например имидазол, триазол, чему и будут посвящены следующие исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир. 1988. Т.3.

2. *Бадюгин С.М.* Токсикология синтетических ядов. Казань: Медицина, 1974.
3. *Белоконь Е.М.* Генетический эксперимент в исследованиях на дрозофиле. Львов: Выша школа, Изд. Львовского ун-та, 1979.
4. *Вакулко О.П., Пурыгин П.П., Селезнева Е.С., Иванов И.П.* Исследование мутагенной активности некоторых веществ группы N,N'-тиокарбонилбензотриазола. Тез. докл. обл. научно-техн. конф. "60-летию СССР – ударный труд, знание, инициативу и творчество молодых". Куйбышев, 1983.
5. *Васильева И.И.* Токсикология новых химических веществ и гигиене труда при их производстве и применении / Гиг. труда. 1970. №3.
6. *Захваткин Ю.А.* Курс общей энтомологии. М.: Колос, 2001.
7. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990.
8. *Медведев Н.И.* Практическая генетика. М: Наука, 1968.
9. Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле. Под ред. *В.В. Хвостовой, Л.И. Корочкина, М.Д. Голубовского.* Новосибирск: Наука. Сиб. отделение, 1977.
10. *Прозоровский В.Б.* Токсикология новых химических веществ // Фармакол. и токсикол. 1962. №1.
11. *Crow J.F.* Genetics of insect resistance to chemicals // Am.Rev.Entomology. 1957. V21.
12. *Fox G.A.* Tinkering with the Tinkerer: Pollution versus Evolution. Environmental Health Perspectives. 1995. V.103.
13. *Meller G.* Selection for DDT resistance in inbred, laboratory and wild stocks of *Drosophila melanogaster* // J. Ecol. Entomol. 1959. V.23.

THE DROSOPHILA ADAPTATION MECHANISMS TO BENZOTRIASOLE

© 2006 E.S. Selezneva

Samara State University

The *Drosophila* adaptation mechanisms to sub-lethal benzotriazole doses are investigated. It is shown that benzotriazole induces dominant and recessive lethal mutations both in non-toxic dose (0,1 mg/ml) and LD₅₀ dose. Under constant benzotriazole action in LD₅₀ dose during 5 generations the mortality decrease in all ontogenesis stages and fertility rehabilitation. The experiments on prolonged and short pre-adaptation to non-toxic dose to mutagen action of LD₅₀ dose showed the difference in mutagen answer of *Drosophila* males and females. It is shown that adaptation appearance to tested xenobiotic is connected with organisms selection on highly active resistance during gametogenesis period