

INSTYTUT FIZYKI JADROWEJ
INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS
ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ



KRAKÓW

RAPORT No 1511/B

INP - 1511/B.

CZY CHEMIZACJA ROLNICTWA
ZAGRAŻA ŚRODOWISKU BARDZIEJ
NIŻ PROMIENIOWANIE ?

KRAKÓW 1990

**CZY CHEMIZACJA ROLNICTWA ZAGRAŻA ŚRODOWISKU BARDZIEJ NIŻ
PROMIENIOWANIE ?**

/MATERIAŁY Z BADAŃ NAD MUTAGENNOŚCIĄ, ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN/

POD REDAKCJĄ ANTONINY CEBULSKIEJ-WASILENSKIEJ

KRAKÓW 1990

**WYDANO NAKŁADEM
INSTYTUTU FIZYKI JĄDROWEJ
IM. HENRYKA NIEWOONICZAŃSKIEGO
KRAKÓW, UL. RADZIKOWSKIEGO 152**

Kopię kserograficzną, druk i oprawę wykonano w IFJ Kraków

Wydanie I

Zam. 131/80

Nakład 80 egz.

Praca wykonana w problemie B4-02 : "Badania nad mutagennym oddziaływaniem stosowanych w rolnictwie środków chemicznych", w ramach programu CPBR 10.13 "Metody radiacyjne w rolnictwie"

SPIS TRESCI

1. BADANIA NAD MUTAGENNYM DZIAŁANIEM ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN

A.Cebulska-Wasilewska, S.Macugowski, H. Piłciennik, R.Smoliński..7

2. ZASTOSOWANIE MUTACJI BARWNIKOWYCH *CHLORELLA V.* I MUTACJI MITOCHONDRIALNYCH *SACCHAROMYCES CER.* DO OCENY MUTAGENNEJ AKTYWNOŚCI ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN

H.Piłciennik, S.Smoliński.....29

3. SYNERGIZM W INDUKOWANIU MUTACJI U *TRADESCANTIA* PRZEZ ŚRODKI OCHRONY ROŚLIN WSPÓLDZIAŁAJĄCE Z PROMIENIOWANIEM JONIZUJĄCYM

A.Cebulska-Wasilewska, J. Szagała.....53

4. BADANIA WPŁYWU MUTAGENNEGO DECISU I DELTAMETRYNY NA *TRADESCANTIA* - AUTOMATYZACJA ZBIERANIA DANYCH

W.Wajda, A. Cebulska-Wasilewska.....63

5. ZASTOSOWANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH I WYMIEN SIÓSTRZANYCH CHROMATYD W LIMFOCYTACH KRWI LUDZKIEJ W OCENIE EFEKTYWNOŚCI ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN

A.Wierzewska , E.Kasper, B.Krzykwa.....81

6. OCENA MUTAGENNYCH SKUTKÓW BADANYCH ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN

A.Cebulska-Wasilewska, J.Huczowski, H. Piłciennik.....93

WSTĘP

Właściwe oszacowanie ryzyka wynikającego istniejących zagrożeń stanowi zagadnienie dość skomplikowane. Odczucie opinii publicznej nie zawsze jest oparte na racjonalnych przesłankach. Jest ona najbardziej wyczulona na zagrożenie związane z promieniowaniem jonizującym. Na przykład ryzyko, jakie jest związane z prześwietlaniem klatki piersiowej odpowiada liczbowo ryzyku związanemu z przejechaniem samochodem odległości 100 kilometrów. Ale, odczucie opinii publicznej historycznie uwrażliwionej na promieniowanie przypisuje na pewno większą wagę pierwszemu. Tymczasem rosnące stale chemiczne zanieczyszczenie środowiska naturalnego staje się poważnym problemem.

W Polsce jak i na całym świecie stale zwiększa się liczba produkowanych związków należących do grupy środków ochrony roślin. Niezależnie od niewątpliwych korzyści płynących dla społeczeństw z podniesienia poziomu upraw, część tych związków stanowi równocześnie potencjalne zagrożenie dla środowiska i zdrowia człowieka. Ujemne skutki ich pojawienia się w środowisku mogą się objawić w postaci zwiększonej częstości indukowania rozwoju komórek rakowych, dziedzicznych uszkodzeń genetycznych, czy też nawet mogą być przyczyną tzw. dryftu genetycznego. Z tego powodu, szczególnej wagi nabierają badania, w wyniku których uzyskuje się nowe informacje odnośnie kancerogenności lub mutagenności popularnie stosowanych związków lub preparatów. Mamy nadzieję że przedstawione w niniejszej pracy rezultaty badań nad mutagennością niektórych stosowanych powszechnie środków roślin, stanowią ważne uzupełnienie tak potrzebnych informacji, odnośnie genotoksycznych skutków tych środków. Z drugiej strony mamy również nadzieję że porównanie skutków biologicznych tych preparatów ze skutkami

biologicznego promieniowania jonizującego, ułatwi właściwe zrozumienie ryzyka wynikającego dla człowieka i środowiska ze stosowania tych środków, a w związku z tym przyczyni się do rozważenia zysków i strat wynikających z ich stosowania i być może do lepszego sterowania ich użytkowaniem.

Antonina Cebulska-Nasilewska

BADANIA NAD MUTAGENNYM DZIAŁANIEM ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN

A. Cebulska-Wasilewska, S. Macugowski, H. Płuciennik, R. Saoliński

WSTĘP

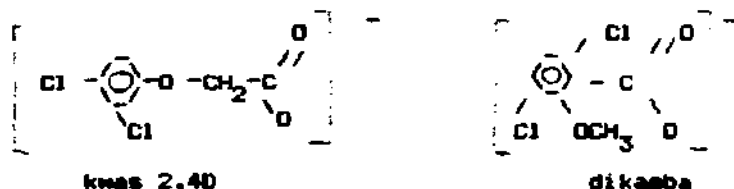
Wprowadzenie i stosowanie dużej ilości nowych środków ochrony roślin w rolnictwie spowodowało, że oprócz badań toksykologicznych coraz częściej pojawiają się prace dotyczące takich właśnie efektów wywołanych działaniem tych związków u roślin i zwierząt. Najlepiej pod tym względem są zbadane związki z grupy insektycydów. Mniej uwagi do tej pory przywiązywano do badań nad herbicydami. Celem badań, których rezultaty częściowo prezentowane są w niniejszej pracy było zbadanie preparatów będących w aktualnym zastosowaniu w rolnictwie obszarów Polski Północnej, pod kątem ich mutagennej aktywności. W doborze preparatów do badań kierowano się sugestiami Stacji Ochrony Roślin w Krakowie.

Ocenę mutagennej aktywności preparatów badanych przeprowadzono z zastosowaniem następujących metod badawczych: mutacji barwnikowych u *Chlorella vulgaris* (1), somatycznych u *Tradescantia* (2) i mitochondrialnych u *Saccharomyces cer.* (1). Postanowiono również przynajmniej dla niektórych z badanych związków przeprowadzić test indukowania aberracji chromosomowych i wymian chromatydowych w komórkach limfocytów (3). Badania prowadzono na preparatach użytkowych, oraz wybranych substancjach aktywnych wchodzących w skład tych preparatów, takich jak: Aminopieilik oraz kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy, Afalon, Ambusz, Ripkard, Decis 2,5 EC oraz deltametryna, Bi-58, Prometen a także Tiuraa. Ponadto przeprowadzono badania porównawcze stosując znane mutageny chemiczne takie jak np. akrydyna i EMS (etylosulfonian etylowy) oraz mutagen fizyczny tzn. promieniowanie jonizujące gamma i X.

ZWIĄZKI BADANE

Aminopieślik D

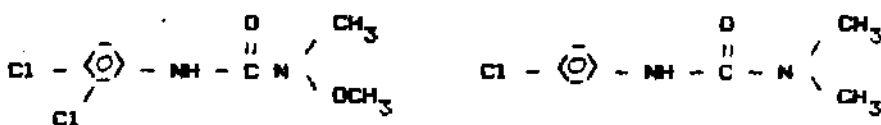
Najważniejsze ze związków chwastobójczych stosowanych w Polsce można zaliczyć do dwóch grup : kwasów aryloksyalkanokarboksylowych oraz pochodnych mocznika. Jednym z tych preparatów jest Aminopieślik, stosowany w uprawach zbóż ozimych. Składnikami aktywnymi w tym preparacie są 2,4D / kwas 2,4-dwuchloro-fenoksyoctowy, w ilości 36% / i dikamba / kwas 3,6-dwuchloro-2-metoksybenzoesowy - 2,8% / w formie soli dwumetyloaminowych. Struktura tych związków przedstawiona jest na Rys.1. Kwas 2,4 D przenika do tkanek roślin głównie przez liście



(4,5) i działa podobnie do hormonów roślinnych-auksyn (6) powodując nadmierny rozwój tkanek, skręcanie, wędnięcie i usychanie roślin.

Afalon

Afalon należy do stosowanych często w Polsce herbicydów z grupy pochodnych mocznika. Jest to preparat produkcji Fabryki Hoechst AG / NRF /. Składnikiem czynnym tego preparatu jest linuron /N-/3,4-dwuchlorofenyl-N-metoksy-N-metylmocznik -50% /. wzór tego związku przedstawiony jest na Rys.1A:



Rys.1A linuron

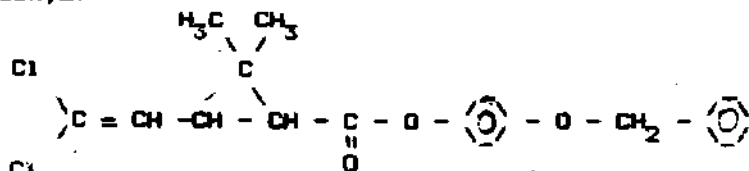
Rys.1B: monuron

Stosowany on jest do zwalczania chwastów jednorocznych

dwuliściennych w marchwi, pietruszkach, selerach, porach, kminu, ziemniakach, kukurydzy i słończniku. Herbicyd ten wnika przez korzenie i liście powodując zaburzenia w procesie fotosyntezy (4). Pod tym aspektem był dobrze przebadany w układach *in vitro* (5). Herbicyd ten odznacza się znaczną stabilnością w glebie. W zależności od wilgotności i temperatury rozkłada się w czasie 1-3 miesięcy (4).

Ambusz 25 EC, Ripcord 40

Kolejnym związkiem poddanym badaniom był Ambusz 25 EC. Należy on do grupy pyretroidów syntetycznych. Pyretroidy są substancjami wykazującymi działanie kontaktowe lub żądłkowe, ulegają silnej absorpcji na cząstkach gleby i w niskich temperaturach są bardzo toksyczne (7). Wymienione środki posiadają silne właściwości owadobójcze, działają na szkodniki już w dawkach dziesięciokrotnie mniejszych niż związki fosforoorganiczne lub karbaminiany. Aktywną substancją Ambuszu jest permetryna o następującym wzorze chemicznym:

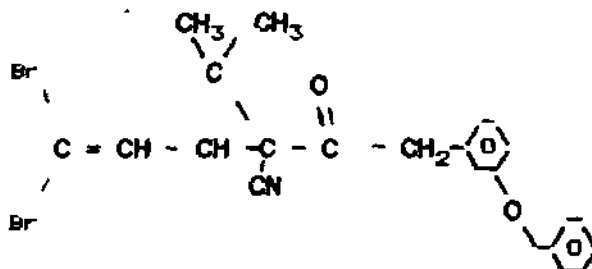


Ambusz 25 EC zawiera 25% tej substancji aktywnej i zalicza się do IV klasy toksyczności. Zakres jego działania w uprawach roślin użytkowych jest rozszerzony aktualnie do zwalczania szkodników magazynowych.

Do tej samej grupy związków co Ambusz, wywodzących się z naturalnych pyretroidów będących pochodnymi kwasu pyretrynowego względnie estrów kwasu chryzantesowego, należy następny badany związek Ripcord, z tym że jego substancją aktywną nie jest permetryna lecz cypermetryna.

Decis 2,5 EC

Następnym badanym środkiem ochrony roślin był preparat Decis 2,5 EC i jego substancja aktywna deltametryna. Decis 2,5 EC jest nazwą handlową preparatu owadobójczego również o działaniu kontaktowym. Służy do zwalczania owadów gryzących i ssących w uprawach rolniczych. Jego substancja aktywna biologicznie, deltametryna ma następujący wzór strukturalny:

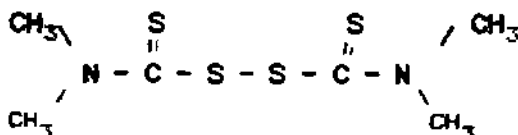


(3- α -cyano-3-fenoksybenzylo-1Rcis-3-2,2-dwubromowinylic-2,2-dwumetylo-karboksylan)

Bi 58 EC, Prometen, Tiuran

Preparatami należącymi także do grupy związków owadobójczych były Bi-58 EC i Prometen, Bi-58 to preparat należący do II klasy toksyczności zawierający 37% substancji aktywnej (dimetolat) tzn. dwutiofosforanu S-/N- metylokarbamylometylo/-0,0 dwumetylowego. Prometen płynny to preparat owadobójczy o działaniu kontaktowym i żołądkowym. Składniki aktywne w tym preparacie to: metoksychlor (12%), propoksur (7%) i eudosulfan (6%).

Ostatnim związkiem badanym był dwusiarczek-bis-N,N-dwumetylotiokarbamidu o nazwie handlowej Tiuran i następującym wzorze strukturalnym :



Wchodzi on w skład preparatów użytkowych Sadoplion 75 oraz zaprawa nasienna I. Jest to środek grzybobójczy stosowany do zaprawiania nasion zbóż, warzyw oraz do ochrony papieru i skór. Uznawany jest za mało toksyczny dla ludzi.

REZULTATY

W tabeli 1 przedstawiono zestawienie odpowiedzi zastosowanych testów mutagenności na badane preparaty i związki.

Tabela 1

Ódpowiedzi testów na mutagenność dla różnych badanych preparatów handlowych oraz ich substancji aktywnych

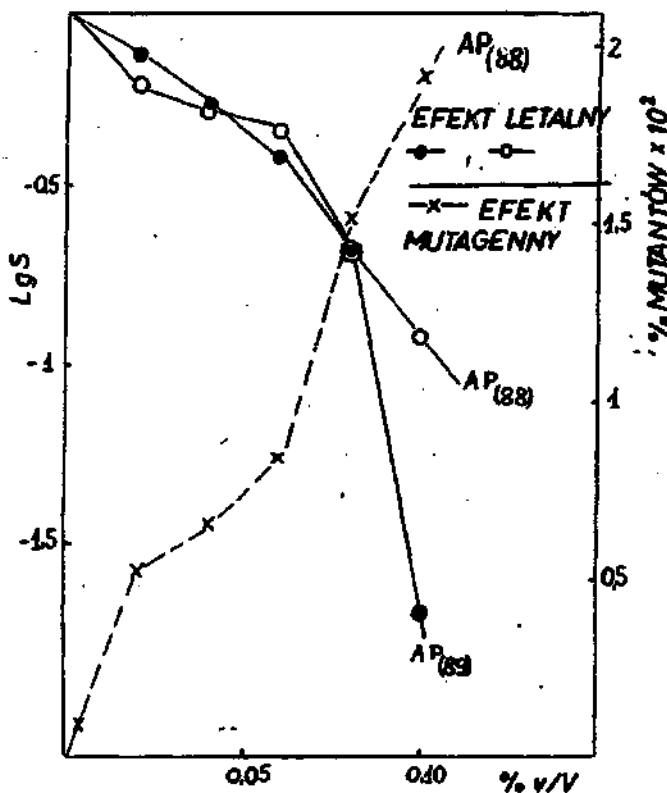
Test <i>Chlorella v.</i> - <i>Saccharomyces cer.</i> - <i>Tradescantia</i> -Aberracje.				
Preparat			chromos.	
Aminopielik	+ *	-	+	+ *
2,4 D	-	-	nb	nb
Afalon	nb	nb	+	-
Ambusz	+	+	+	nb
Ripkord	nb	nb	+	nb
Decis	-	+	+/-	+ **
Deltametryna	-	-	+	nb
Bi-SB	nb	nb	-	nb
Prometen	nb	nb	+	nb
Tiuraa	-	-	nb	nb

* wynik pozytywny zależny od roku produkcji
 ** test wymian chromatydowych
 nb nie badano

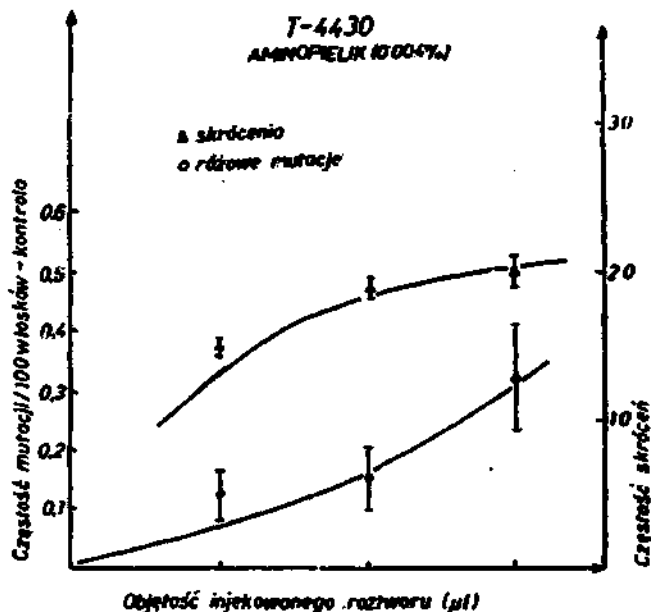
Wpływ ekspozycji na preparat użytkowy Aminopielik na przeżywalność oraz częstość mutacji indukowanych u *Chlorella vulg.* przedstawiono na rysunku 2. Linia ciągłą przedstawiono

przeżywalność kolonii po traktowaniu różnymi stężeniami preparatu Aminopielik 88 i 89, natomiast linią przerywaną efekt mutagenny zaobserwowany tylko u preparatu Aminopielik 88.

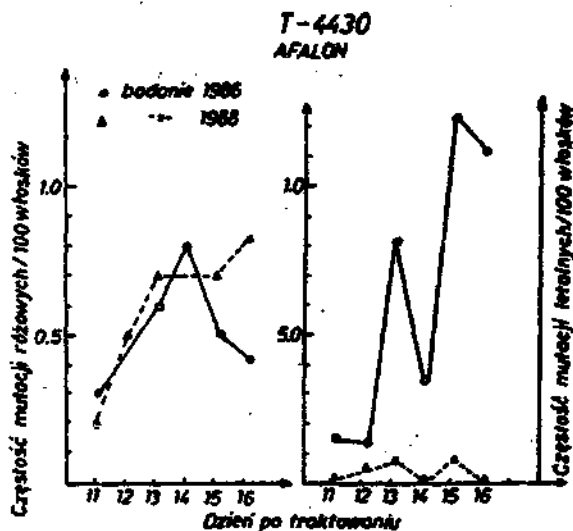
Zależność częstości zdarzeń letalnych oraz mutacji somatycznych indukowanych w komórkach włosków pręcików *Tradescantia* różnymi ekspozycjami na Aminopielik przedstawiono na rysunku 3. Zarówno w przypadku *Chlorella vulg.* jak i w przypadku *Tradescantia* obserwowane zależności efektu mutagennego od ekspozycji na mutagen mają charakter zbliżony do liniowej zależności.



RYS.2. Letalne i mutagenne działanie preparatów aminopieliku rocznik 1988 i 1989 na komórki *Chlorella vulg.*



RYS.3. Zależność częstości mutacji różowych oraz letalnych (skręceń) od wielkości ekspozycji na Aminopielik wyrażonej iloczynem stężenia i objętości iniekowanego roztworu.

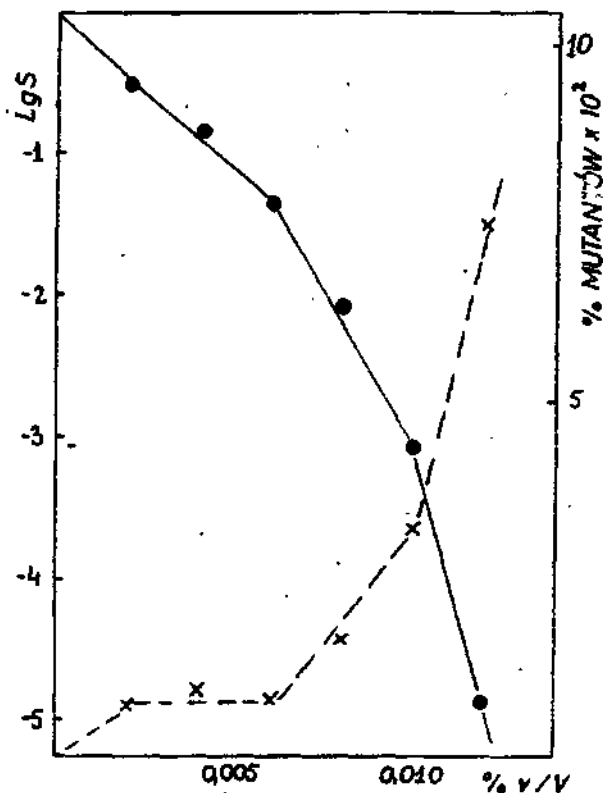


RYS.4. Kształtowanie się częstości mutacji różowych i letalnych w komórkach włosów precyków *Tradescantia* po traktowaniu roślin roztworami afalonu (świeżym i dwuletnim)

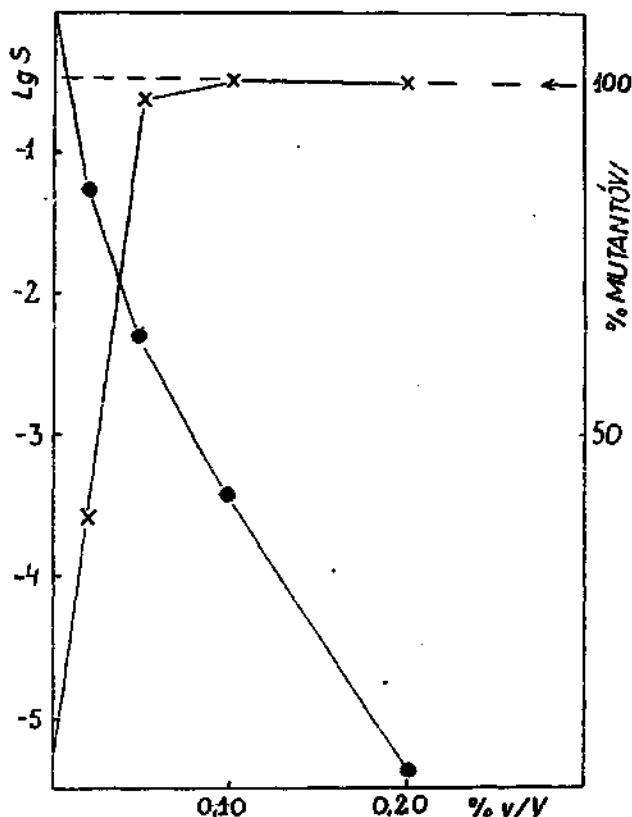
Badając mutagenny wpływ kwasu 2,4 D na *Chlorella vulg.* oraz na *Saccharomyces cerev.* nie stwierdzono istotnego statystycznie wzrostu częstości mutacji (1).

Afalon, Ambusz,

Przykłady mutagennego wpływu traktowania roślin *Tradescantia* roztworami preparatu Afalon różniącymi się czasem ich sporządzenia przedstawiono na Rys.4. Preparat starszy cechuje się wyraźnie niższą toksycznością (wyraźne obniżenie częstości indukowanych mutacji letalnych) natomiast wykazuje on podwyższoną aktywność

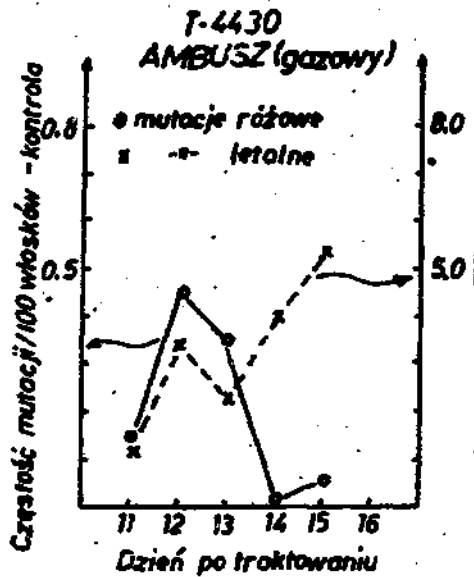


RYS.5. Letalne i mutagenne działanie preparatu Ambusz 25 EC na komórki *Chlorella vulg.*

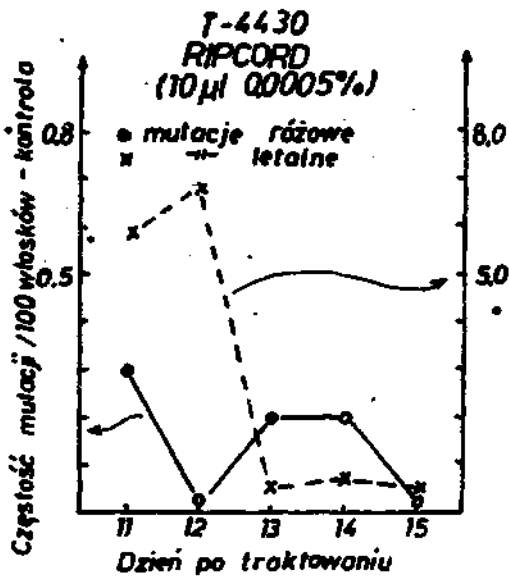


RYS.6. Letalne i mutagenne działanie preparatu Ambusz 25 EC na komórki *Saccharomyces cer.*

mutageną. Na rysunku 5 przedstawiono wyniki przeżywalności i mutagenności uzyskane po traktowaniu *Chlorella vulg.* różnymi stężeniami preparatu Ambusz 25 EC, natomiast dane na rysunku 6 prezentują efektywność toksyczną i mutageną tego preparatu stwierdzoną po traktowaniu *Saccharomyces cerev.* Rezultaty badań efektywności mutagennej Ambuszu w indukowaniu mutacji somatycznych u *Tradescantia* przedstawiono na rysunku 7. Dane wykazują, że we wszystkich trzech zastosowanych testach na mutagenność tego preparatu uzyskano wynik pozytywny.



RYS.7. Mutagenny wpływ preparatu Ambusz na rośliny *Tradescantia*



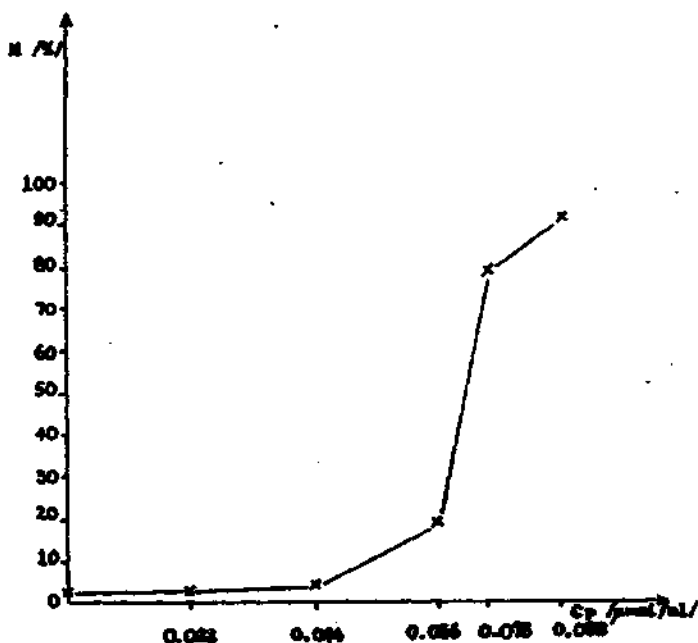
RYS.8. Kształtowanie się częstości mutacji u *Tradescantia* w różnych dniach od traktowania roślin preparatem Ripcord

Ripcord

Badania nad mutagennością preparatu Ripcordu prowadzonych z zastosowaniem układu modelowego *Tradescantia* były bardzo utrudnione ze względu na silne obniżenie intensywności kwitnienia pod wpływem działania tego preparatu. Pomimo tego, stwierdzono jednak wyraźny wpływ tego preparatu podwyższający częstość mutacji somatycznych u *Tradescantia* Rys.8.

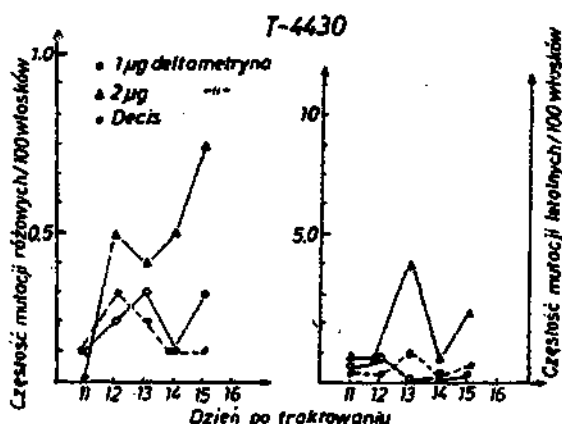
Decis i deltametryna

Mutagenną efektywność preparatu użytkowego Decis 2.5 EC badano zarówno na mikrobiologicznych modelach mutacyjnych *Chlorella vulg.* i *Saccharomyces cerev.* jak również na modelu *Tradescantia*.. Preparat wywołuje silny efekt letalny u *Saccharomyces cerev.* natomiast nie zwiększa częstości występowania mutantów barwnikowych u *Chlorella*. Działanie tego preparatu na



RYS.9. Mutagenne działanie preparatu DECIS na *Saccharomyces cerev.*

Saccharomyces cerev. również wywołuje silny efekt letalny. W zakresie stężeń do 0,07 $\mu\text{m/ml}$ nie zaobserwowano powstawania mutacji mitochondrialnych u *Saccharomyces cerev.*, natomiast wyższe stężenia wywołały gwałtowny wzrost częstości pojawiania się minikolonii. Zjawisko to jest najprawdopodobniej skutkiem toksycznego działania tego preparatu na mitochondria (Rys.9.). Traktowanie *Chlorella vulg.* i *Saccharomyces cerev.* alkoholowym roztworem deltametryny nie wykazało mutagennego działania tej substancji. Odmiennie rezultaty uzyskano badając ten preparat na roślinach *Tradescantia*. Wprawdzie zaobserwowane podwyższenie częstości mutacji u *Tradescantia* na skutek traktowania roślin preparatem Decis 25 EC jest niewielkie i brak powtarzalności we wszystkich eksperymentach, ale za to wyraźny efekt występuje dla deltametryny. W przypadku deltametryny rozpuszczonej w DMSO, która potraktowano kwiatostany, obserwowany efekt mutageny jest statystycznie istotnie różny od poziomu mutacji występującego w grupie kontrolnej (Rys.10).



RYS.10. Kształtowanie się częstości mutacji różowych i letalnych u *Tradescantia* w różnych dniach od traktowania roślin preparatem Decis oraz deltametryną

Bi-58, Prometen

Po traktowaniu roślin preparatem Bi-58 o stężeniu zalecanym do stosowania w rolnictwie, nie stwierdzono wpływu na podwyższenie częstości mutacji u *Tradescantia*. Traktowaniu poddano grupę ~100 roślin i nie stwierdzono statystycznie istotnego wzrostu częstości mutacji różowych u *Tradescantia*. Podobnie, dużą grupę (~100) roślin potraktowano roztworem Prometenu o stężeniu zalecanym do zastosowania w praktyce ~0,3%. U roślin tych stwierdzono podwyższenie poziomu mutacji (0,34mut/100), w związku z powyższym w miarę możliwości będą kontynuowane badania nad tym związkim.

Tiuram

W badaniach nad wpływem traktowania kultur *Chlorella vulg.* oraz *Saccharomyces cerev.* roztworem alkoholowym Tiuramu na poziom mutacji indukowanych u tych kultur, nie stwierdzono mutagennego efektu tego traktowania (1).

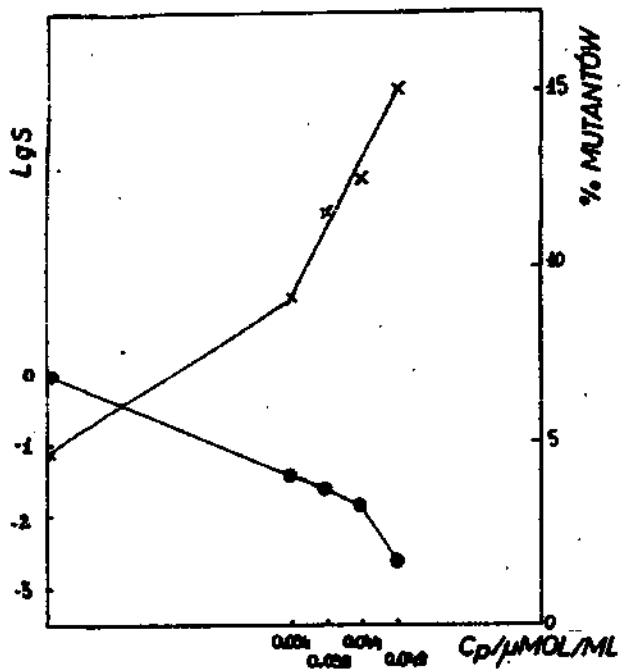
*

BADANIA PORÓWNAWCZE

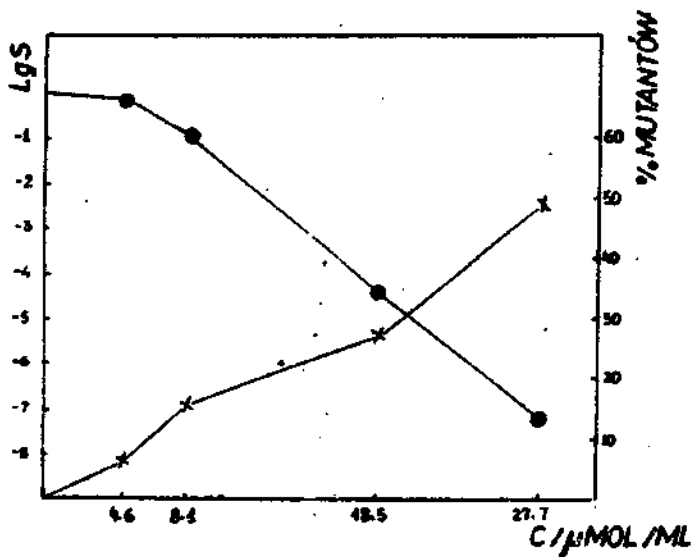
Prowadząc badania nad mutagennością preparatów użytkowych oraz ich substancji biologicznie czynnych stwierdzono, że aby podjąć próbę oszacowania stopnia ewentualnego zagrożenia środowiska wynikającego ze stosowania badanych preparatów konieczne jest porównanie skutków biologicznych badanych preparatów z efektami wywołanymi przez znane mutageny. Do tego celu wybrano akrydynę, EMS, i promieniowanie jonizujące.

Akrydyna

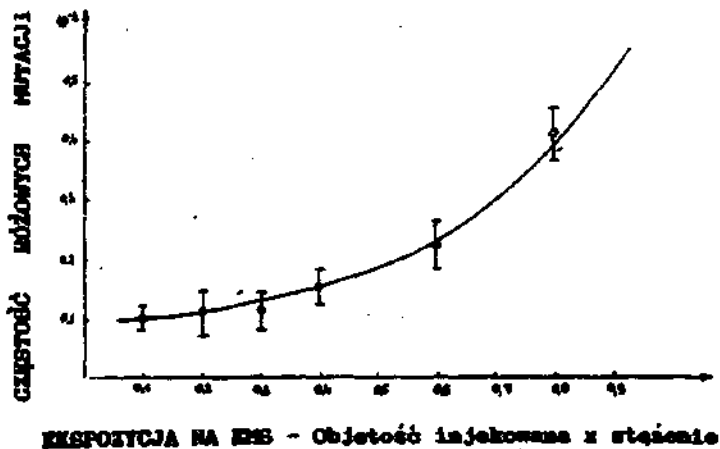
Akrydynę wybrano do badań mutagenności w przypadku *Saccharomyces cerev.* ze względu na fakt, że EMS nie wywołuje mutacji mitochondrialnych u drożdży. Zależność efektów mutagennych i letalnych u *Saccharomyces cerev.* od stężenia oraz objętości zastosowanej do badań akrydyny przedstawiono na Rys. II.



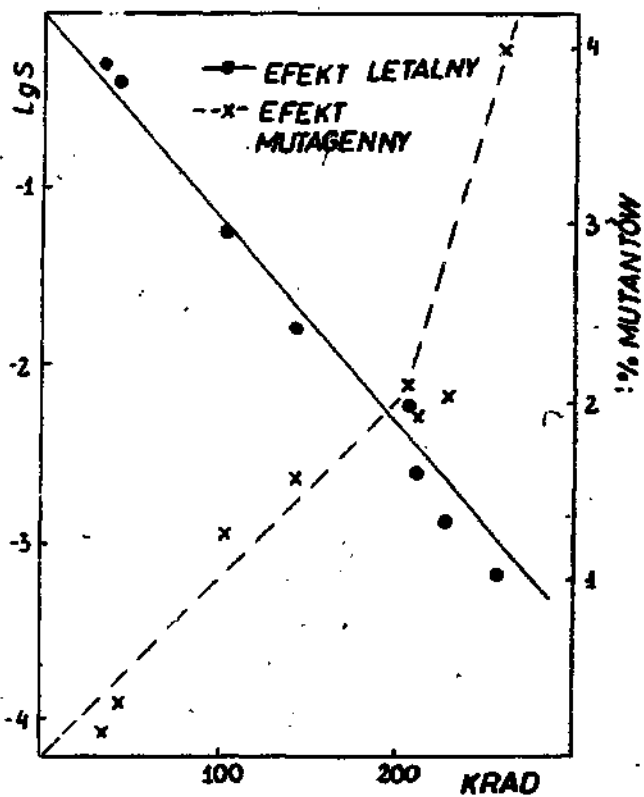
RYS.11. Letalne i mutagenne działanie akrydyny na komórki *Saccharomyces cerevisiae*.



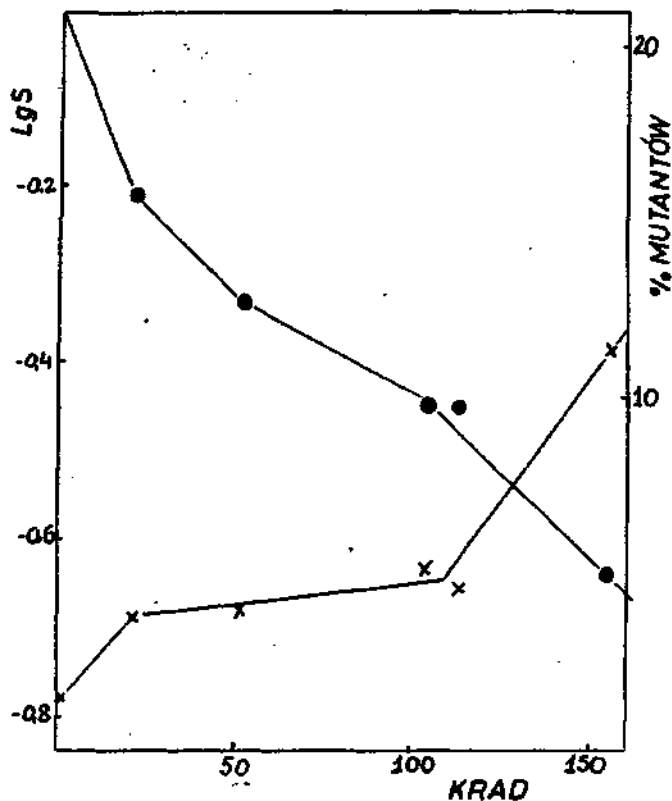
RYS.12. Letalne i mutagenne działanie EMS *Chlorella vulgaris*.



RYS.13. Wpływ stężenia EMS na częstość mutacji u *Tradescantia*



RYS.14. Letalny i mutagenny wpływ promieniowania na *Chlorella v.*



RYB.15 Letalne i mutagenne działanie promieniowania gamma na komórki *Saccharosyces cerev.*

EMS

Częstość mutacji barwnikowych oraz letalnych u *Chlorella vulg.* oraz różowych u *Tradescantia* wywołanych działaniem roztworów o różnych stężeniach EMS-u przedstawiono odpowiednio na rysunkach 12 i 13.

Promieniowanie jonizujące.

Wpływ wielkości dawki pochłoniętej promieniowania gamma na częstość zdarzeń mutacyjnych i letalnych indukowanych u *Chlorella vulg.* przedstawiono na Rys 14, natomiast u *Saccharosyces cerev.* na

Rys. 15. Zależność od dawki promieniowania i efektów obserwowanych u *Tradescantia* przedstawiono na Rys. 16 (2).

DYSKUSJA

W przypadku preparatu Aminopielik stwierdzono u *Tradescantia* aktywność mutagenną wszystkich badanych preparatów, natomiast u *Chlorella vulg.* oraz *Saccharomyces cerev.* tylko preparat z roku 1988 wykazywał cechy mutagenne. Nie stwierdzono natomiast aktywności mutagennej preparatu Aminopielik 89 ani też formy aktywnej tego preparatu tzn kwasu 2,4 D. Ponieważ 2,4 D jest składnikiem wielu herbicydów, badano jego genotoksyczną aktywność przy użyciu różnych testów na bakteriach (8), komórkach roślinnych (9) i komórkach zwierzęcych (10). W przypadku użycia czystego chemicznie związku z sześciu stosowanych testów w czterech nie stwierdzono w ogóle jego wpływu na wzrost poziomu mutacji. Dodatkowo wyniki genotoksyczności uzyskano tylko na bakteriach *Bacillus subtilis* szczepów rac^+ i rac^- (8) i komórkach eukaryotów korzeniowego *Allium cepa* (10). Drugi składnik Aminopielika D - dikamba był aktywny w dwóch z czterech stosowanych testów, oba były przeprowadzane na bakteriach (8). Należy jednak podkreślić, że preparaty stosowane w rolnictwie w zależności od technologii ich uzyskiwania zawierają różne ilości zanieczyszczeń, wśród których można wyliczyć kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy, 2,4,5-trichlorofenol, 2,4-dichlorofenol i inne. Również w literaturze występują doniesienia, że takie komercyjne preparaty 2,4 D różnią się od czystego 2,4 D genotoksycznością (10).

Preparat Afalon w badaniach prezentowanych w niniejszym opracowaniu badano tylko z zastosowaniem testu na *Tradescantia*. Wykazał on mutagenny wpływ na rośliny, poza tym stwierdzono, że mutagenność tego preparatu wzrasta w czasie jego "starzenia się" i

obniżania jego toksycznych właściwości

Z grupy związków pochodnych mocznika i zbliżonych bardzo budową do Afalonu genotoksyczne właściwości badano dla monuronu (Rys.1B). Z pięciu stosowanych testów tylko w jednym testie wykazywał on właściwości mutagenne (8).

Wydaje się również, że interesująco wygląda porównanie rezultatów uzyskanych dla preparatów Ambusz i Decis. Posiadają one zbliżone chemiczną budową substancje aktywne. W trzech zastosowanych testach nie stwierdzono aktywności mutagennej preparatu Decis-58 natomiast wszystkie zastosowane testy wykazały mutagenność Ambuszu, w którym parastryna jest substancją aktywną. Tylko test oparty o mutacje somatyczne u *Tradescantia* wykazał aktywność mutagenną, roztworu substancji biologicznie aktywnej preparatu Decis, w uznawanym za biologicznie obojętnym rozpuszczalniku, tzn DMSO. Fakt ten może zarówno świadczyć o wyjątkowej wrażliwości *Tradescantia*, ewentualnie może być efektem współdziałania pomiędzy rozpuszczalnikiem a substancją aktywną i byłoby właściwe sprawdzenie na *Tradescantia* mutagenności tej substancji rozpuszczonej np w alkoholu.

Ostatni z badanych insektycydów nie wykazał aktywności mutagennej ani w odniesieniu do *Chlorella v.* ani do *Saccharomyces c.*

W tabeli 2 przedstawiono częstości mutacji indukowanych przez badane związki i obserwowanych na poziomie 50% przeżywalności komórek poddanych traktowaniu. Pozwala to na porównanie ich efektywności mutagennej z aktywnością mutagenną znanych mutagenów chemicznych o także promieniowania jonizującego. Pozwala również na próbę klasyfikacji tych związków w zależności od ich efektywności w wywoływaniu skutków pożądanых tzn toksycznych oraz niepożądanych czyli mutagennych.

Tabela 2

Częstość mutacji (%) indukowana przez badane preparaty i związki, w różnych testach na poziomie 50% przeżywalności komórek testowanych

Chlorella v., Saccharomyces cerev., Tradescantia

Prosimionanie	0,13	2,63	45,0
Kwas 2,4 D	0	0	nb
Aminopielik 88	0,0075	0,91	11,71
Aminopielik 89	0	0	2,02
Afalon	nb	nb	2,5
Afalon (dwuletni)	nb	nb	29,46
Ambusz	0,0018	3,8	2,74
Decis	0	0	0,55
Deltametryna	0	0	12,03
Bi-58	nb	nb	0
Prometen	nb	nb	?
Tiuran	0	0	nb
EMS	0,12	nb	17,85
Akrydyna	nb	0,32	nb

Oceniając przebadane preparaty z tego punktu widzenia, w świetle przedstawionych w tabeli 2 zdolności mutagennych tych preparatów wydaje się, że najmniej korzystne w praktyce jest stosowanie preparatów Ambuszu i Aminopielika.

LITERATURA CYTOWANA

1. Płuciennik H., Smoliński S., Zastosowanie mutacji barwnikowych *Chlorella v.* i mutacji mitochondrialnych *Saccharomyces cer.* do oceny mutagennej aktywności środków ochrony roślin.
Raport IFJ w druku.
2. Cebulska-Wasilewska A., Działanie mutagenne promieniowania jonizującego oraz czynników chemicznych i środowiskowych u *Tradescantia*
3. Wierzevska A., Kasper E., Krzykwa B., Aberracje chromosomowe i wymiany chromatyd siostrzanych w limfocytach krwi ludzkiej w ocenie efektywności środków ochrony roślin. Raport IFJ w druku
4. Byrdy B., Górecki K., Łaszcz E.: Pestycydy. PWRiL 1976.
5. Zimmermann N.H., Milburn J.A. (eds) Transport in Plants. Phloem Transport, Encyklopedia of Plant Physiology New Series, vol. 1. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1975.
6. Corbett J.R.: The Biochemical Mode of Action of Pesticides. Academic Press, London-New York 1974.
7. E.Markiewicz-Jodko, Perspektywy stosowania w ochronie roślin nowych insektycydów z grupy syntetycznych perytryn., Ochrona Roślin, 6,6-7, 1978.
8. Klopfan G., Contreras R., Rosenkranz H.S., Waters M.D.: Structure Genotoxic Activity Relationships of Pesticides. Comparison of the Results from Several Short-Term Assays. Mutation Res. 147 (1985) 343-356.
9. Fiskesje G., Lassen C., Renberg L.: Chlorinated Phenoksyacetic Acid and Chlorophenols in the Modified Allium Test. Chem.-Biol. Interact. 34 (1981) 333-344.
10. Mustonen R., Kangas J., Vuojolahti P., Linnainmaa K.: Effects of Phenoksyacetic Acid on the Induction of Chromosome Abberations

in Vitro and in Vivo.

11. Carcinogenicity and pesticides Issues and Relationships. *As. Chem. Soc. Symposium. Series. No 414. 1990.*

ZASTOSOWANIE MUTACJI BARWNIKOWYCH *Chlorella vulgaris* I MUTACJI
MITOCHONDRIALNYCH *Saccharomyces cerevisiae* DO OCENY MUTAGENNEJ
AKTYWNOŚCI ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN

H. Fluciennik i S. Smoliński

Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii

I. W p r o w a d z e n i e

Chemizacji rolnictwa towarzyszy zanieczyszczenie środowiska różnymi substancjami chemicznymi. Niektóre z nich mogą być mutagenami. Substancje te bezpośrednio lub pośrednio mogą przenikać do organizmu człowieka i wywoływać mutacje. Istnieje dość ścisły związek pomiędzy mutagenną i kancerogenną aktywnością / 1-10 /. Dlatego każda substancja mutagenna może okazać się kancerogenem. Z tych względów wydaje się ważne oznaczenie mutagennej aktywności wprowadzanych do środowiska substancji chemicznych. Temu problemowi dotychczas nie poświęcono dostatecznej uwagi. Dla przykładu, w jednym z nowszych opracowań, dotyczących biologicznej aktywności biocydów i regulatorów wzrostu / 11 /, o mutagennej aktywności wogóle się nie wspomina, chociaż od dość dawna wiadomo, że niektóre biocydy są silnymi mutagenami / 12,13 /.

W tej pracy opisano stosunkowo proste metodyki oznaczania mutagennej aktywności środków chemizacji rolnictwa, w których wykorzystuje się dwa różne modele mutacyjne: model mutacji barwnikowych jednokomórkowego glonu fotosyntezującego *Chlorella vulgaris*, oraz model mutacji mitochondrialnych /oddechowych/ drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*. Opisane metodyki

można traktować jako próbę rozszerzenia baterii już opracowanych metod oznaczania mutagenności, t.zw. testów skróconych, opartych na wykorzystaniu różnych mikroorganizmów, takich jak bakteriofagi /14,15/, bakterie *Bacillus subtilis* /16,17/, *Salmonella typhimurium* /18-23/ i *Escherichia coli* /24-26/, oraz drożdże /27-30/. Jedną z opisanych w tej pracy metodą stanowi rozwinięcie sygnalizowanej wcześniej możliwości wykorzystania do tego celu mutacji barwnikowych glonu *Chlorella* /31,32/.

Przesłanki wyboru modelu mutacji barwnikowych *Chlorella* v. były następujące:

1. Prosta i ogólnie dostępna mikrobiologiczna technika pracy z tym mikroorganizmem na agaryzowanym podłożu z glukozą jako źródłem węgla, umożliwia niezawodną i ilościową rejestrację zarówno wszystkich żywych komórek /zielone kolonie/, jak i mutantów barwnikowych /kolonie białe, sałatkowe, żółte, szeroka gama żółto-zielonych, ceglasto-czerwone/.
2. Aparat genetycznej kontroli złożonych szlaków biosyntezy barwników fotosyntetycznych, oraz genów regulujących funkcjonowanie tego aparatu, jest również bardzo złożony i fizycznie duży /szacunkowo kilkaset genów - kilkaset tysięcy nukleotydów/. Poszczególne geny tego kompleksu są slokalizowane zarówno w DNA jądra, jak i chloroplastu / 33 /. Dzięki temu mutacje barwnikowe powstają z względnie wysoką częstotliwością /spontanicznie około 6×10^{-5} /. Umożliwia to ilościowe oznaczenie częstotliwości powstawania mutacji nawet dla mało aktywnych mutagenów.
3. Mutacje barwnikowe są mutacjami prostymi /w odróżnieniu od wykorzystywanych w wielu testach mikrobiologicznych mutacji wstecznych od stanu zamutowanego do dzikiego fenotypu/.

Dlatego w przypadku mutacji barwnikowych unika się zjawiska specyficzności mutagenyzy, mogącej mieć istotne znaczenie w przypadku mutacji wstecznych.

4. Dzięki stosunkowo wysokiej częstotliwości powstawania mutacji barwnikowych można je ilościowo oznaczyć, wykorzystując dziki szczep - z normalnym systemem naprawy uszkodzeń DNA. Szczepy o podwyższonej wrażliwości na działanie mutagenów /z uszkodzonym systemem naprawy DNA/, często wykorzystywane w testach mikrobiologicznych, mogą cechować się zróżnicowaniem wrażliwości na różne czynniki mutagenne.

Przesłanki wyboru modelu mutacji mitochondrialnych /oddechowych/ drożdży *Saccharomyces cer.* były następujące:

1. Mutanty mitochondrialne /oddechowe/, odkryte przez Sphrussiego przed około 40-tu laty, powstają z dużą częstotliwością /spontanicznie $0.5 - 3 \times 10^{-2}$ /. Sugeruje to, że test oparty na tym modelu mutacyjnym może być znacznie bardziej czuły, niż oparty na modelu mutacji barwnikowych *Chlorella*.

2. Mutanty te mogą być niezawodnie i ilościowo oznaczone na podłożu różnicującym, zawierającym jako główne źródło węgla formy nie ulegające fermentacji /np. glicerol/, oraz glukozę /forma ulegająca fermentacji/jako marginalne źródło węgla.

3. Molekularna istota tych mutacji jest dość dobrze poznana /34, 35/: zawsze przyczyną mutacji jest albo duża delecja w mitochondrialnym DNA /mutanty ρ^{-} /, albo jest to związane z całkowitą utratą tego DNA, prowadzącą do pełnego zaniku mitochondriów w komórce /mutanty ρ^0 /. Z tego względu zarówno mutanty ρ^{-} jak i ρ^0 są mutantami nierewertującymi. Powstające równoległe inne rodzaje mutantów mitochondrialnych / syn^{-} i mit^{-} /

są wynikiem mutacji punktowych, mogą ulegać rewersji, w związku z czym w warunkach doświadczenia ulegają mutacjom wstecznym do dzikiego fenotypu ρ^+ i nie są wykrywane.

Jak wynika z powyższych przesłanek, wybrane dwa modele mutacyjne zasadniczo różnią się między sobą: mutacje barwnikowe są rezultatem szerokiej gamy zmian zarówno w DNA jądra, jak i chloroplastu, lecz nie w DNA mitochondriów; mutanty mitochondrialne ρ^- i ρ^0 są rezultatem dużych delecji lub całkowitej utraty mitDNA. W związku z tym można oczekiwać, że wyniki testowania tej samej substancji chemicznej przy pomocy tak różnych modeli mutacyjnych będą się różniły. Dla przykładu można oczekiwać, że mutagen wywołujący głównie mutacje punktowe będzie mało efektywny w odniesieniu do modelu mutacji mitochondrialnych, natomiast może być efektywny w wywoływaniu mutacji barwnikowych. Doświadczalne potwierdzenie tych oczekiwań może umocnić ogólnie akceptowaną tezę o potrzebie testowania substancji na ich mutagenną aktywność przy pomocy wielu różnych testów /36/.

II. METODYKA TESTOWANIA

II.1. Model mutacji barwnikowych

Do hodowli komórek *Chlorella vulgaris* służy podkoże płynne lub agaryzowane, o następującym składzie:

Podkoże płynne:

Makroelementy i makroskładniki /g/dcm³/

KNO ₃	1.09	CaCl ₂ x H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	0.90	FeSO ₄ x 7 H ₂ O ...	0.0069
Na ₂ HPO ₄	0.28	Na ₂ EDTA	0.0093
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.25	Glukoza	20.0

Mikroelementy /mg/dcm³/

MnSO ₄	0.169	CuSO ₄ x 5H ₂ O ...	0.0025
H ₃ BO ₃	0.061	/NH ₄ / ₂ MoO ₄	0.124
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.287		

Do namnażania pojedynczych komórek i uzyskiwania kolonii stosowano płytki agaryzowane w szalkach Petriego z podłożem stałym o następującym składzie / w g/dcm³/:

Podłoże płynne	1 dcm ³
Pepton	1
Agar	20

Hodowlę komórek zarówno w podłożu płynnym, jak i na płytkach agarowych, prowadzono sterylnie, w temp. +30°C, bez stałego oświetlenia i wymuszonej aeracji. W takich warunkach czas podwojenia liczebności populacji komórek w podłożu płynnym wynosi około 6 godzin, natomiast na płytce agarowej każda żywa komórka po upływie 8 - 10 dni wytwarza makrokolonię o średnicy do 4 mm.

Testowanie substancji chemicznej na jej ewentualną mutagenną aktywność przeprowadzono według następującej procedury. Do serii próbek hodowli płynnej o gęstości około 10⁸ komórek w mililitrze wprowadzano sterylnie badaną substancję /np w postaci roztworu alkoholowego/ w takich ilościach, aby uzyskać określone jej stężenia. Jedną z próbek /kontrola/ nie zawiera badanej substancji, a jedynie alkohol w takiej ilości, jak próbki z badaną substancją. Następnie prowadzono inkubację próbek w temp. +30°C przez okres czasu, wystarczający do zrealizowania przez komórki 2 - 3 podziałów komórkowych /stosowano inkubację przez 12 godzin/. Po zakończeniu inkubacji odpo-

wiednie rozcienczenia każdej próbki wysiewano posiewem muraw-
 kowym na płytki z podłożem stałym. Płytki inkubowano w temp.
 +30°C przez 5 - 10 dni. Po tym czasie każda żywa komórka wytwa-
 rza na płytce makrokolonie. Komórki niezmutowane wytwarzają
 zielone kolonie, natomiast te, w których pod wpływem badanej
 substancji nastąpiło uszkodzenie jednego z genów, determinują-
 cych biosyntezę barwników, wytwarzają kolonie o barwie innej,
 niż zielona /białe, żółte, żółto-zielone itd/. Oznaczanie prze-
 żywalności "S" sprowadza się do zliczenia kolonii na płytkach
 kontrolnych / N_0 /, oraz na płytkach o danym stężeniu badanego
 czynnika mutagenego / N_c /. Przeżywalność wyliczano ze stosun-
 ku:

$$S = \frac{N_c}{N_0}$$

Oznaczanie częstości powstawania mutacji barwnikowych sprowadza
 się do zliczenia na tych samych płytkach tylko liczby kolonii
 barwnych / n_c /. Wskaźnik częstości mutacji wyliczano ze stosun-
 ku:

$$m_c = \frac{n_c}{N_c}$$

Wyniki, otrzymywane w rezultacie przeprowadzenia opisanej pro-
 cedury badawczej, umożliwiają wyznaczenie podstawowych zależ-
 ności, niezbędnych do wytestowania badanej substancji pod ką-
 tem jej aktywności mutagennej: przeżywalność "S", oraz czę-
 stość powstawania mutacji "m" jako funkcje wielkości ekspozycji
 na dany czynnik mutageny. Dla ilustracji możliwości opisanej
 metodyki można przytoczyć wybrane przykłady oznaczeń testowych,
 wykonanych dla kilku biocydów, oraz dla promieniowania gamma
 i klasycznego mutagenu chemicznego /metylosulfonian etylewy

-EMS /, wykorzystanych w charakterze mutagenów odniesienia. Na wykresach, przedstawionych na Fig. 1 i 2, podano wyniki oznaczeń efektów letalnego i mutagennego, wywoływanych przez dwie substancje pochodne trójazyny - desmetrynę i terbutrynę - będące składnikami czynnymi niektórych preparatów użytkowych. Na wykresach, przedstawionych na Fig. 3 podano tylko wielkości efektu letalnego, wywoływanego przez trzy substancje, należące do tej samej grupy biocydów: kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy /2,4-D/, sól amoniową kwasu / $\frac{1}{2}$ /-2-/4-chloro-2-metylofenoksy/-propionowego /MECOPROP - MCPP /, oraz 3-/3,4-dwuchlorofenilo/ /1', 1'-dwumetylomocznik /DIURON/. Wszystkie trzy substancje wywołują silny efekt letalny, natomiast praktycznie nie wywołują mutacji barwnikowych. Na wykresach, przedstawionych na Fig. 4 i 5 pokazano te same efekty /letalny i mutageny/, wywoływane przez metylosulfonian styłowy / EMS /, oraz przez promieniowanie gamma kobaltu-60. Jak wynika z przytoczonych danych, model mutacji barwnikowych *Chlorella vulgaris* poprawnie testuje substancje chemiczne na ich mutagenną aktywność. Świadczy o tym wywoływanie jak efektu letalnego, tak i mutagennego przez EMS /Fig. 4/, oraz przez promieniowanie gamma /Fig. 5/. Są to od dawna znane czynniki mutagenne i na ich działanie powinien pozytywnie reagować każdy model mutacyjny, rekomendowany w charakterze układu testującego.

Interesującą możliwością stwarza odniesienie efektów mutagennych, wywoływanych przez różne czynniki, do tej samej wielkości efektu letalnego. Takie normowanie względem efektu letalnego dla wszystkich omawianych w tej pracy biocydów zostało zaprezentowane na wykresach, przedstawionych na Fig. 6.

Oprócz odpowiedzi na pytanie, czy badana substancja wykazuje właściwości mutagenne, zestawienie takie umożliwia ilościowe porównanie mutagennej efektywności różnych biocydów, o nieznanym mechanizmie działania na DNA. Rzeczywiście, na podstawie danych, zilustrowanych na Fig. 6 można ułożyć następujący szereg mutagennej efektywności:

FROM.GAMMA } EMS } TERBUTRYNA } DESMETRYNA } MCPP-DIURON-2,4-D

Ponadto, porównując wielkości tangensów kątów nachylenia prostych, przedstawionych na Fig. 6, można ilościowo oszacować mutagenną efektywność porównywanych czynników w formie liczbowych indeksów efektywności. Przyjmując wielkość tangensu kąta nachylenia prostej dla promieniowania gamma jako jednostkę takiego indeksu, wprost z wykresów Fig. 6 można odczytać następujące wielkości względnej mutagennej aktywności dla poszczególnych biocydów:

FROM.GAMMA	EMS	TERBUTRYNA	DESMETRYNA	MCPP	DIURON	2,4-D
1	0.3	0.2	0.05	0	0	0

Na tej podstawie można uważać, że np Terbutryna jest mutagenem czterokrotnie bardziej efektywnym, niż desmetryna. Informacje tego rodzaju, dostarczane przez opisaną technikę testowania, mogą być przydatne w praktyce rolniczej i w ochronie środowiska, kiedy występuje możliwość dokonania wyboru pomiędzy różnymi biocydami o podobnym działaniu. Dane tego rodzaju pozwoliłyby dokonać wyboru stanowiącego mniejsze zagrożenie mutagenne dla środowiska naturalnego.

II.2. Model mutacji mitochondrialnych

Drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* są jednokomórkowymi organizmami eukariotycznymi, należącymi do grupy tlenow-

ców fakultatywnych. Główną cechą, odróżniającą je od tlenowców, jest zdolność do realizowania w atmosferze beztlenowej procesów glikolizy i fermentacji, stanowiących alternatywne względem spalania tlenowego źródło ATP. Procesy te są determinowane przez geny, zlokalizowane w DNA jądra komórkowego. Natomiast procesy oddychania tlenowego są realizowane w mitochondriach i są determinowane przez geny zlokalizowane w mitochondrialnym DNA /mitDNA/. Gdyby w komórce, należącej do grupy tlenowców, nastąpiła dezaktywacja, lub eliminacja mitochondriów, zostałaby ona pozbawiona źródła ATP i musiałaby zginąć. Natomiast w przypadku drożdży inaktywacja czy utrata mitochondriów nie musi prowadzić do śmierci komórki, jeżeli tylko w podłożu będą obecne formy węgla, ulegające fermentacji /np glukoza/. W proponowanej technice testowania biocydów na ich wartagenną aktywność, wspomnianą wyżej właściwość drożdży wykorzystuje się do detekcji mutantów oddechowych /mitochondrialnych/, u których wskutek mutacji w mitDNA następuje utrata biologicznej aktywności mitochondriów. Technika wykorzystania tej możliwości jest następująca. Jeżeli skonstruujemy skład podłoża dla drożdży w taki sposób, że głównym źródłem węgla w nim będzie forma nie ulegająca fermentacji /taką formą jest glicerol/, natomiast źródłem marginalnym będzie forma ulegająca fermentacji /np glukoza/, to na takim podłożu mogą się rozmnażać zarówno komórki wyposażone w sprawne mitochondria, jak i mutanty z uszkodzonym aparatem genetycznym tych organelli. Z tą jednakże różnicą, że w takim samym czasie na w/w podłożu utwardzonym agarem komórki niezmutowane wytworzą makrokolonie, gdyż w podłożu znajduje się duża ilość przyswajalnej dla nich formy węgla, natomiast komór-

ki, w których została wywołana mutacja w mtDNA, wytwarzają mikolonie, gdyż dla nich przyswajalną na drodze fermentacji formą węgla będzie glukoza, obecna w podłożu w marginalnej ilości. Wychodząc z przedstawionej możliwości morfologicznego różnicowania kolonii komórek niezmutowanych i mitochondrialnych mutantów oddechowych drożdży, dla ilościowej detekcji tych mutantów stosuje się agaryzowane podłoże różnicujące /YEPdif/ o następującym składzie:

ekstrakt drożdżowy 10 g
 pepton 10 g
 glicerol 20 g
 glukoza 5 g
 agar 20 g
 bufor fosforanowy pH 6.6 do 1 dcm³

Natomiast do namnażania komórek drożdży stosuje się podłoże płynne YEPglu o składzie:

ekstrakt drożdżowy 10 g glukoza 20 g
 pepton 10 g bufor fosf. pH 6.2 do 1 dcm³

Metodyka testowania substancji chemicznych pod kątem możliwości wywoływania przez nie mutacji mitochondrialnych jest następująca. Do serii próbek hodowli komórek drożdży na podłożu płynnym wprowadza się badaną substancję w ściśle określonych stężeniach, następnie próbki inkubuje się w temp. + 28°C przez okres czterech godzin. W tym czasie w hodowli kontrolnej zachodzi kilka /2 do 3/ podziałów komórkowych. Po inkubacji odpowiednie rozcieńczenia każdej próbki zostają wysiane posiewem murawkowym na płytki z podłożem różnicującym YEPdif. Płytki inkubuje się w temp. +28°C przez 3-4 dni. Po tym czasie każda żywa komór-

ka drożdży wytwarza kolonię. Kolonki niesmutowane wytwarzają makrokolonie o średnicy 20 - 25, natomiast mutanty oddechowe /mitochondrialne/ wytwarzają mikrokolonie o średnicy około pięciokrotnie mniejszej. Przeżywalność "S" można wyznaczyć ze stosunku:

$$S = \frac{N_c}{N_0}$$

w którym N_0 - liczba kolonii na płytkach kontrolnych

N_c - liczba kolonii na płytkach z próbkami, poddanymi działaniu badanej substancji.

Częstość powstawania mutacji mitochondrialnych " m_c " dla danego stężenia mutagenu można wyznaczyć ze stosunku:

$$m_c = \frac{n_c}{N_c}$$

w którym: n_c - liczba mikrokolonii, N_c - liczba wszystkich kolonii.

Dla zilustrowania funkcjonowania tego modelu mutacyjnego jako testu na mutagenność, na Fig. 7 przedstawiono w formie graficznej wyniki oznaczeń efektu letalnego i mutagennego, wywołanych przez promieniowanie gamma, a na Fig. 8 - efekt letalny i mutagenny wywołwane przez preparat użytkowy AMBUSZ 25 EC, substancją czynną którego jest permetryna.

Jak wynika z prezentowanych na w/w Figurach zależności, model mutacji mitochondrialnych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* również udziela poprawnej odpowiedzi na pytanie, czy testowana substancja wykazuje mutagenną aktywność.

Na zakończenie należy zaznaczyć, że w ostatnim okresie można zauważyć znaczny wzrost zainteresowania problematyką mutagennej i kancerogennej aktywności biocydów, szczególnie pestycydów. Przejawem tego może być zorganizowanie po raz

pierwszy przez Amerykańskie Towarzystwo Chemiczne specjalnego Sympozjum, poświęconego wyłącznie tej tematyce / 37 /.

III. L i t e r a t u r a c y t o w a n a

1. Miller E.C., Miller J.A., The mutagenicity of chemical carcinogens, problems and interpretations. In: CHEMICAL MUTAGENS, PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION. Ed. A.Hollaender, 1971.
2. Miller J.A., Miller E.C., Chemical carcinogens, mechanisms and approaches to its control. J.NATL.CANCER INST. 47, V-IV /1971/.
3. Bartsch H., Grover P.L., Chemical carcinogenesis and mutagenesis. In: SCIENTIFIC FOUNDATIONS OF ONCOLOGY. Ed. Synington T. and Carter R.L., London 1976.
4. Bridges B.A., Short-term screening tests for carcinogens. NATURE / L /, 261, 195 - 200 / 1976 /.
5. McCann J., Ames B.N., Detection of carcinogens and mutagens in the Salmonella /microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. PROC.NATL.ACAD.SCI., 73, 950 - 954 /1976/.
6. Purchase J.F.H., Longstaff E., Ashby J., Styles J.A., Anderson D., Lefevre P.A., Westwood F.R., Evaluation of six short-term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use. NATURE /L/, 264, 624-7/1976/.
7. Stoltz D.R., Poirier L.A., Irving C.C., Stich H.F., Weisburger J.H., Grice H.C., Evaluation of short-term test for carcinogenicity. TOXICOL.APPL.PHARMACOL., 29, 157-80/1974/.
8. Sugimura T., Sato S., Nagao M., Iyagahi T., Matsushima T., Seino I., Takemshi N., Kawachi T., Overlapping of carcinogens and mutagens. In:FUNDAMENTAL IN CANCER PREVENTION.

Ed. Magge P.N. et al., Tokyo 1976.

9. **SHORT-TERM TEST SYSTEMS FOR DETECTING CARCINOGENS.** Ed. Norpoth K.H., and Garner R.C., Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1980.
10. **MUTAGENICITY TESTING: A PRACTICAL APPROACH.** Ed. S.Venitt and Parry J.M., Irl.PressLtd, Oxford, England 1984.
11. Pfister K., Urbach W., Effects of biocides and growth regulators: Physiological basis. In: **ENCYCLOPEDIA OF PLANT PHYSIOLOGY.** Vol. 12D, p.329 . Ed. Lange O.L. et al., Springer-Verlage, Berlin-Heidelberg, 1983.
12. Mc Mahan R.E. et.al., Assay of 855 test chemicals in ten tester strains a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. **CANCER RES.**, 39, 682 /1979/.
13. Abbondandolo A., Collection and evaluation of data mutagenic effects of environmental chemicals. **COMM. EUR. COMMUNITIES, EUR.**, 1970, p.670.
14. Corbett T.H., Heidelberg C., Dove W.F., Determination of the mutagenic activity to bacteriophage T4 of carcinogenic and non-carcinogenic compounds. **MOL. PHARMACOL.**,
= 6 /6/, 667-679 /1970/.
15. Drake J.W., Mutagens screening with virulent bacteriophages. In: **CHEMICAL MUTAGENS, PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION.** Vol. I, pp 219-234. Ed.Hollaender,1971.
16. Herriott R.H., Effects on DNA: Transforming principle. In: **CHEMICAL MUTAGENS, PRINCIPLES AND METHODS FOR DETECTION.** Vol.I, pp 175-218. Ed. Hollaender A., 1971..
17. Maher V.M., Curren R.D., Cuellette L.M., McCormick J.J., Effect of DNA repair on the frequency of mutations induced

- in human cells by ultraviolet irradiation and by chemical carcinogens. In: FUNDAMENTAL IN CANCER PREVENTION. Ed. Magee P.N., Tokyo, 1976.
18. Ames B.N., The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: CHEMICAL MUTAGENS, PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION. Vol.I, pp 267-282. Ed. Hollaender A., 1971.
 19. Ames B.N., Sims P., Grover F.L., Epoxides of carcinogenic polycyclic hydrocarbons are frameshift mutagens. SCIENCE, 176, 47 - 49 /1972/.
 20. Ames B.N., Gurney E.G., Miller J.A., Bartsch H., Carcinogens and frameshift mutagens: Metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. PROC.NATL.ACAD.SCI., 69, 3128-3132 /1972/.
 21. Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E., An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. PROC.NATL.ACAD.SCI., 70, 782 /1973/.
 22. Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E., Lee F.D., Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. PROC.NATL.ACAD.SCI., 70, 2281-2285 /1973/.
 23. Ames B.N., Mc Cann J., Yamasaki E., Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella /mammalian microsomal mutagenicity test/. MUTATION RES ., 31.347/1975/.
 24. Bridges B.A., Short-term screening test for carcinogens. NATURE /L/, 261, 195-200 /1976/.
 25. Mohn G., Revertants of an Escherichia coli K12 strain with high sensitivity to radiations and chemicals. MUTATION RES., 19, 349-355 /1973/.

26. Moreau P., Bailone A., Devoret R., Propage lambda induction in Escherichia coli K-12 env A uvr B: A highly sensitive test for potential carcinogens. PROC.NATL.ACAD.SCI., 23, 3700-3704 /1976/.
27. Loprieno N., et.al., Induction of gene mutations and gene conversions by vinyl chloride metabolites in yeast. CANCER.RES., 37, 253-257/1976/.
28. Marquardt H., Mutation and recombination experiments with yeast as prescreening tests for carcinogenic effects. Z. KREBSFORSCH., 81, 333-346/1974/.
29. Mortimer R.K., Manney T.R., Mutation induction in yeast. In: CHEMICAL MUTAGENS, PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION. Vol.I, pp 289-310. Ed. Hollaender A., 1971.
30. Zimmerman F.K., Detection of genetically active chemicals using various yeast system. In: CHEMICAL MUTAGENS, PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION. Vol.III, pp.209-240. Ed. Hollaender A., 1971.
31. Pluciennik H., Die mutagene wirkung des zerfalls von inkorporiertem radioaktivem phosphor-32auf Chlorella vulgariszellen. MAT.SYMP."ALGEN ALS INDIKATOREN", Kötten, 1984, pp 65-69.
32. Pluciennik H., Ispolzovanije pigmentnych mutacii Chlorella dija kollektivnoj ocenki mutagennoj aktivnosti sredstv chimizacii selskogo chozjajstva. MAT.XVII Konf.probl. RWPG-1.18.3. TEBON, 1985.
33. Sager R., Genetic analysis of chloroplast DNA in Chlamydomonas. ADV.GENET., 19, 287-340/1977/.
34. Lloyd D., The mitochondria of microorganisms. AP,Lond.1974.

35. Rytka J., Putrament A., Kruszevska A., Baranowska H.,
Kotylak Z., Genetyka i biogeneza mitochondriow w drożdżach
Saccharomyces cerevisiae. POSTĘPY MIKROBIOLOGII,
12, 3-59 /1978/.
36. ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA. Vol. VI. PRINCIPLES AND
METHODS FOR EVALUATING THE TOXICITY OF CHEMICALS.
WHO, Geneva 1978.
37. CARCINOGENICITY AND PESTICIDES. PRINCIPLES. ISSUES AND
RELATIONSHIPS. Amer.Chem.Soc.Symp. Series N^o 414, 1990.

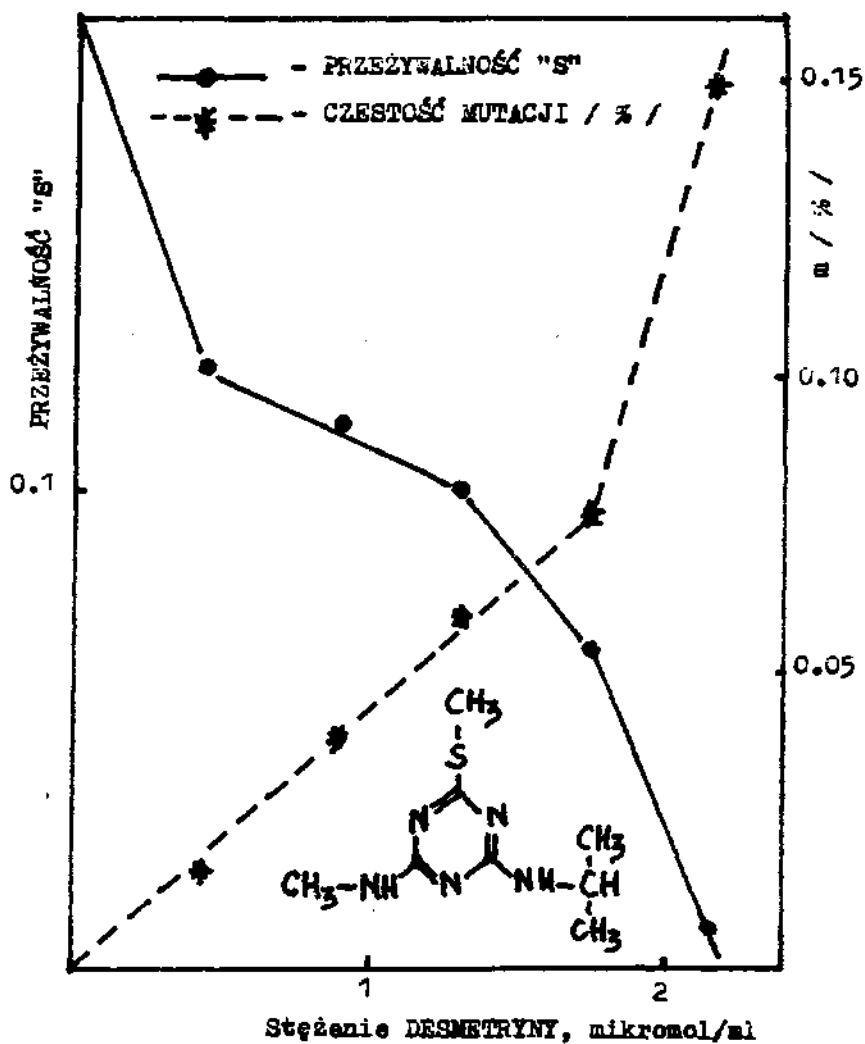


FIGURA 1. Letalne i mutagenne działanie DESMETRYNY
 na komórki *Chlorella vulgaris*

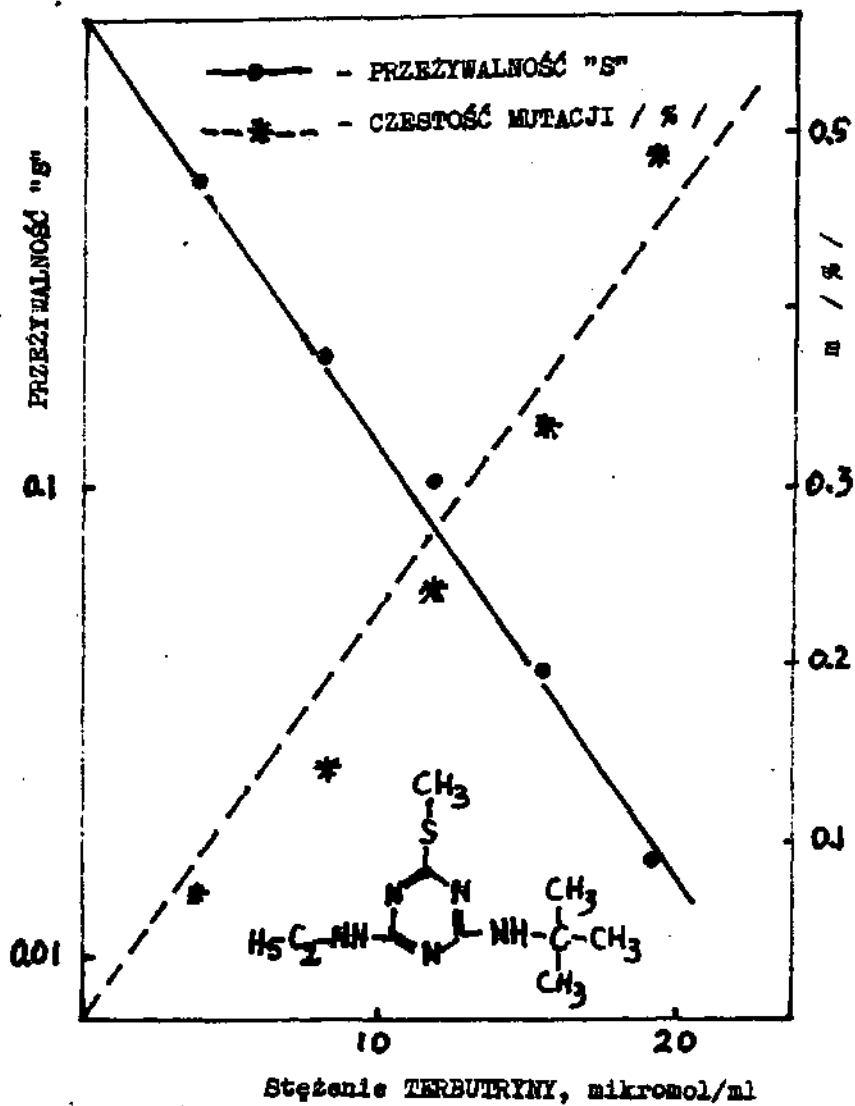


FIGURA 2. Letalne i mutagenne działanie TERBUTRYNYX na komórki *Chlorella vulgaris*

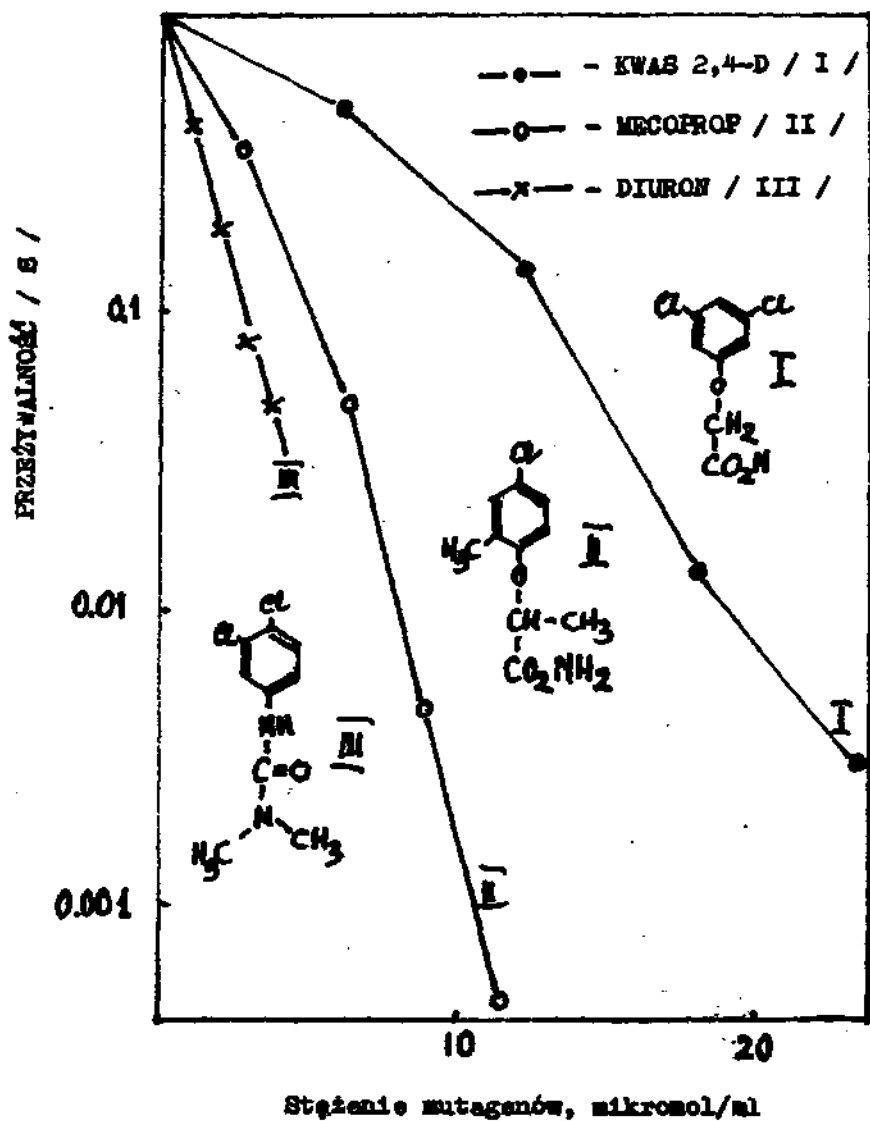


FIGURA 3. Letalne działanie KWASU 2,4-D, MECOPROFU i DIURONU na komórki *Chlorella vulgaris*. Mutagennego działania w/w biocydów nie wykryto.

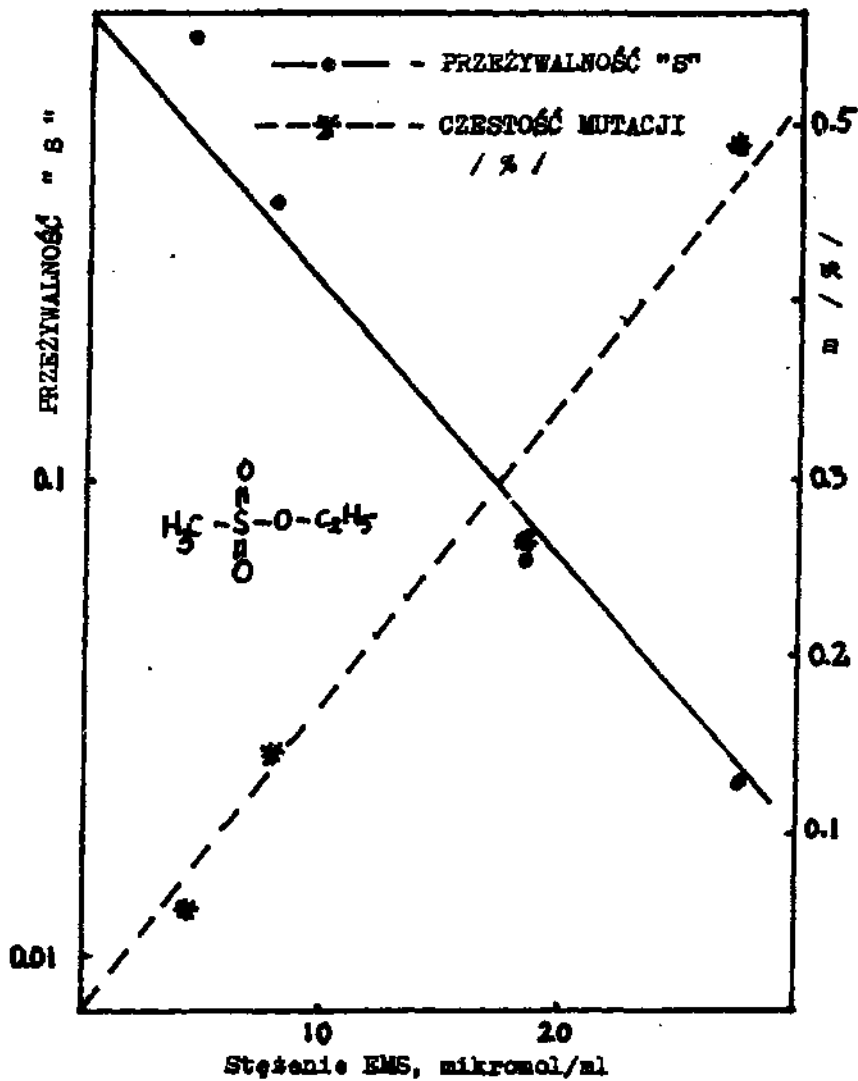


FIGURA 4. Letalne i mutagenne działanie EMS na komórki *Chlorella vulgaris*.

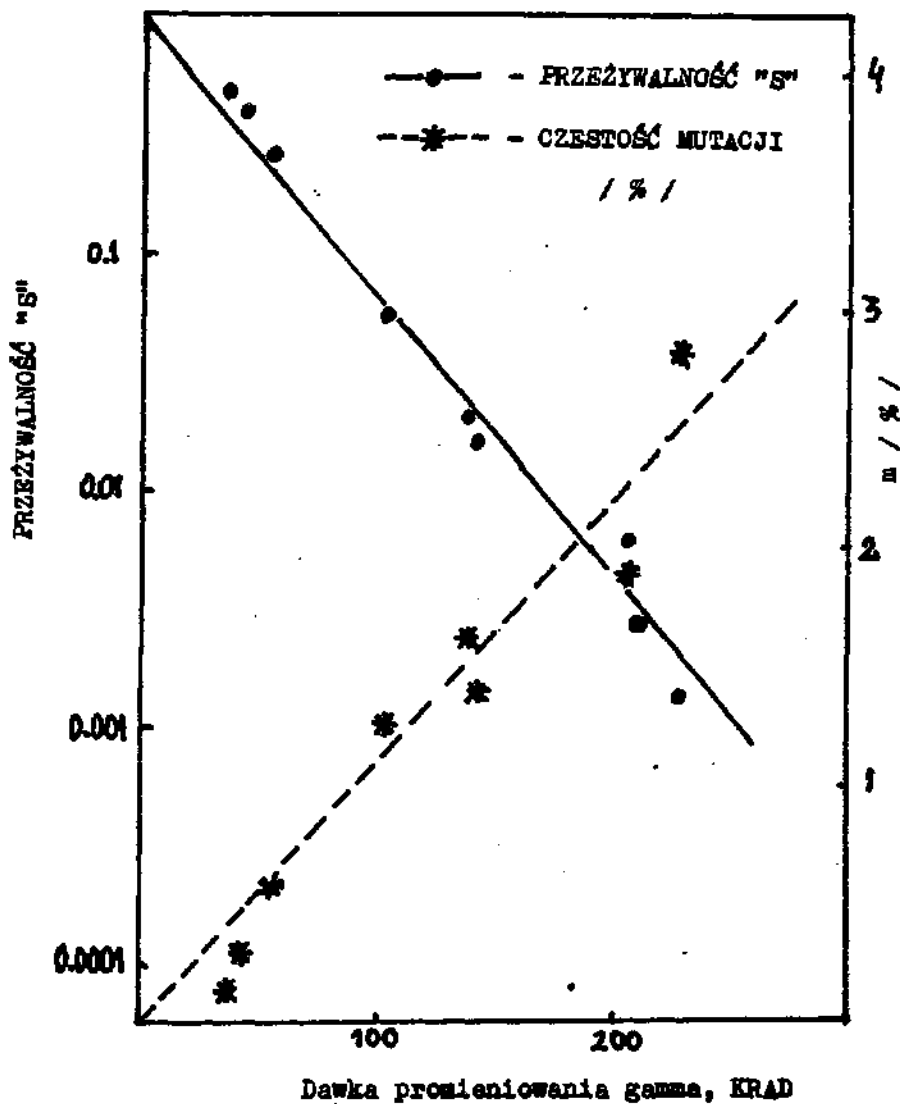


FIGURA 5. Letalne i mutagenne działanie promieniowania gamma kobaltu-60 na komórki *Chlorella vulgaris*.

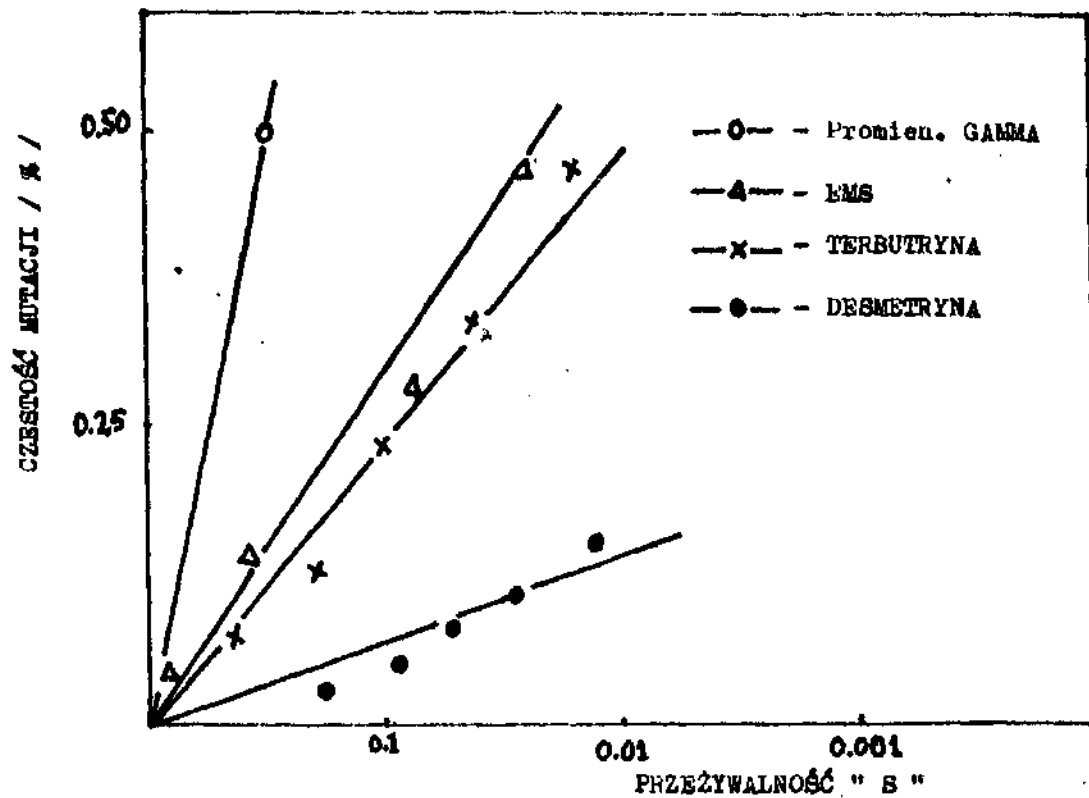


FIGURA 6. Porównanie mutagennej aktywności testowanych mutagenów

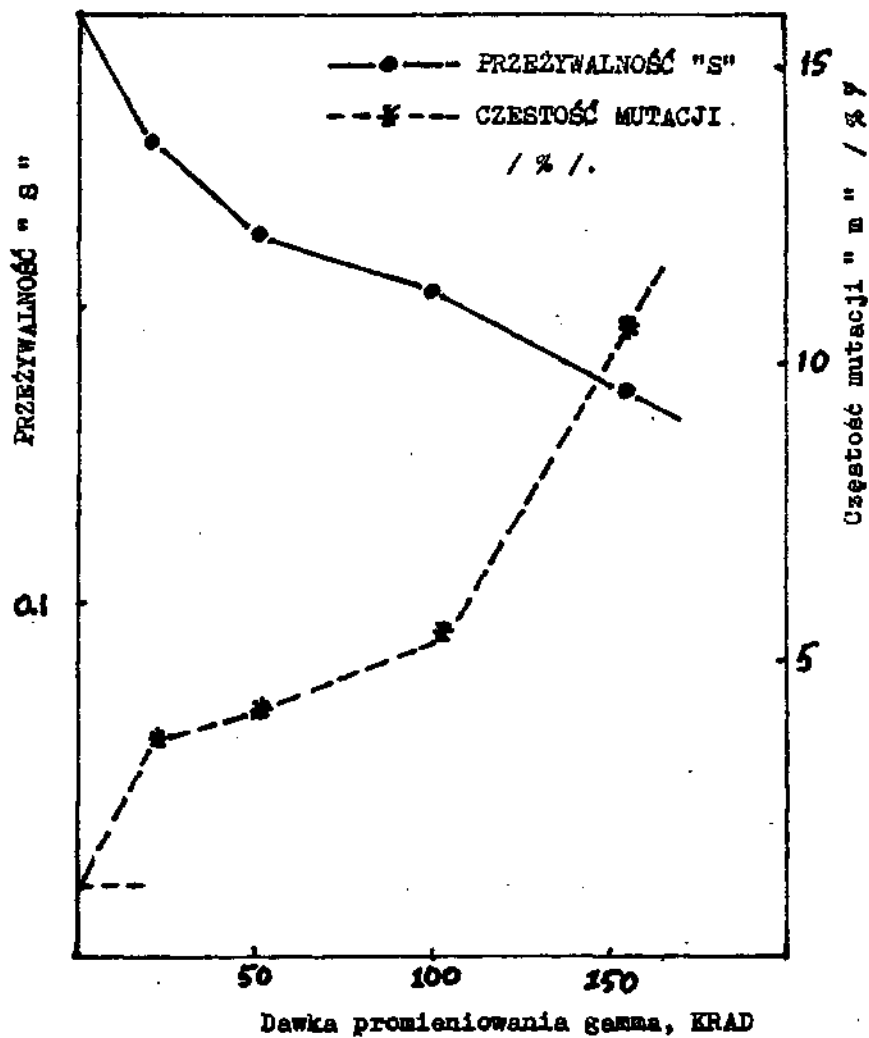


FIGURA 7. Letalne i mutagenne działanie promieniowania gamma kobaltu-60 na komórki *Saccharomyces cerevisiae*.

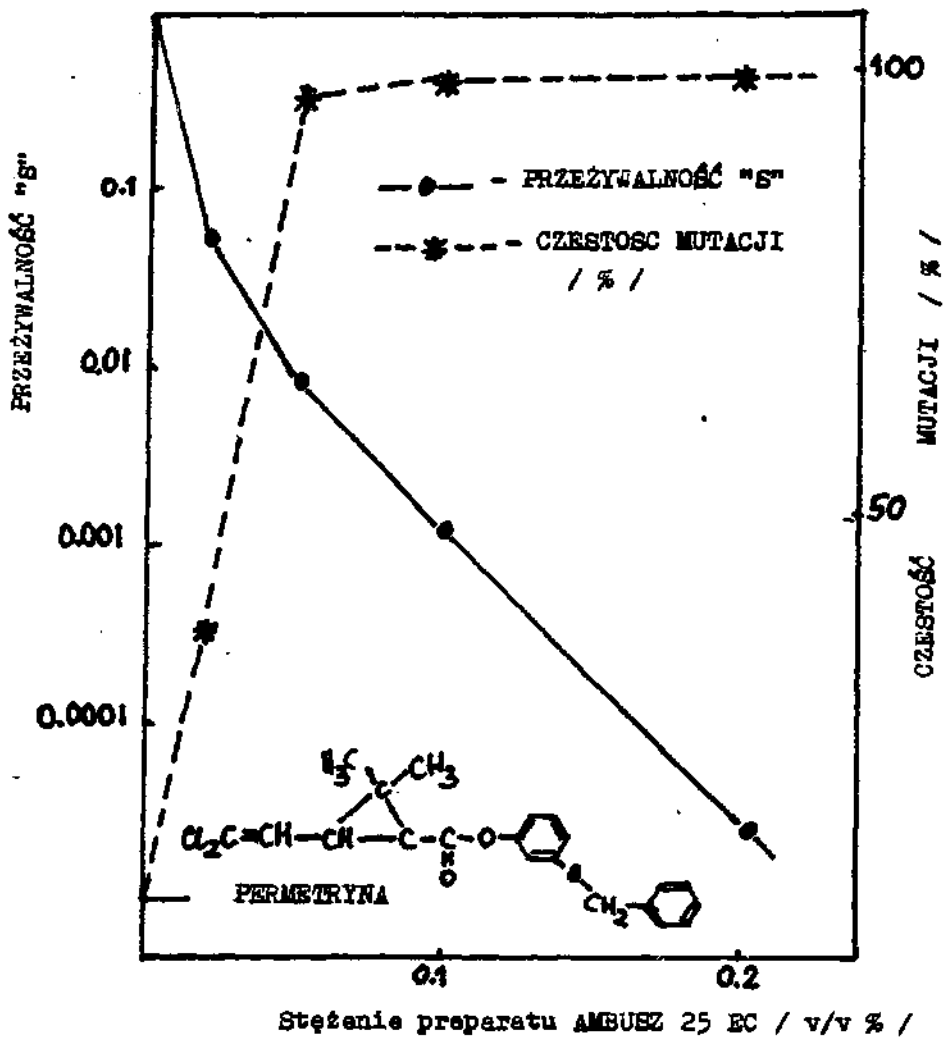


FIGURA 8. Letalne i mutagenne działanie preparatu AMBUSZ 25 EC na komórki *Saccharomyces cerevisiae*.

SYNERGIZM W INDUKOWANIU MUTACJI U *TRADESCANTIA* PRZEZ ŚRODKI
OCHRONY ROŚLIN WSPÓLDZIAŁAJĄCE Z PROMIENIOWANIEM JONIZUJĄCYM

Antonina Cebulska-Masilewska, Janusz Saagała

WSTĘP

Efekt synergistyczny ma miejsce wtedy gdy efekt równoczesnego działania dwóch czynników przewyższa sumę ich indywidualnych oddziaływań. Synergistyczne współdziałanie było stwierdzone dotąd dla przeżywalności komórek dla wielu różnych czynników. Udowodnienie występowania efektu synergistycznego dla mutacji przy współdziałaniu promieniowania jonizującego i chemicznych mutagenów ma ogromne znaczenie dla mutagenyzy roślin użytkowych, a także dla ochrony radiologicznej i ochrony środowiska. Badania przeprowadzone na *Tradescantia*, nad współdziałaniem promieniowania jonizującego ze znanymi mutagenami chemicznymi takimi jak EMS oraz DBE dały rezultaty potwierdzające istnienie synergizmu dla mutacji. Badania te stanowią właściwie pierwsze światowe udokumentowane doświadczalnie i uzasadnione teoretycznie doniesienie na temat występowania synergistycznego efektu dla mutacji, przy zastosowaniu niskich dawek współdziałających razem: promieniowania X, oraz chemicznego mutagenu (1,2,3). Waga i znaczenie problemu potencjalnego synergizmu, ogromną jego rolę dla ważnej problematyki rakotwórczości, oraz oszacowania zagrożeń dla człowieka wynikających z obecności w środowisku czynników mutagennych, wyznaczają pilną potrzebę badań nad współdziałaniem różnych mutagenów środowiskowych. Ponieważ w środowisku naturalnym człowieka jest zawsze obecne promieniowanie jonizujące, z tego względu w prezentowanych w niniejszym opracowaniu, badaniach nad

mutagenością stosowanych w rolnictwie środków ochrony roślin uwzględniono badania nad współdziałaniem z promieniowaniem jonizującym tych z badanych środków ochrony roślin, które wykazały w testach mutagenny charakter.

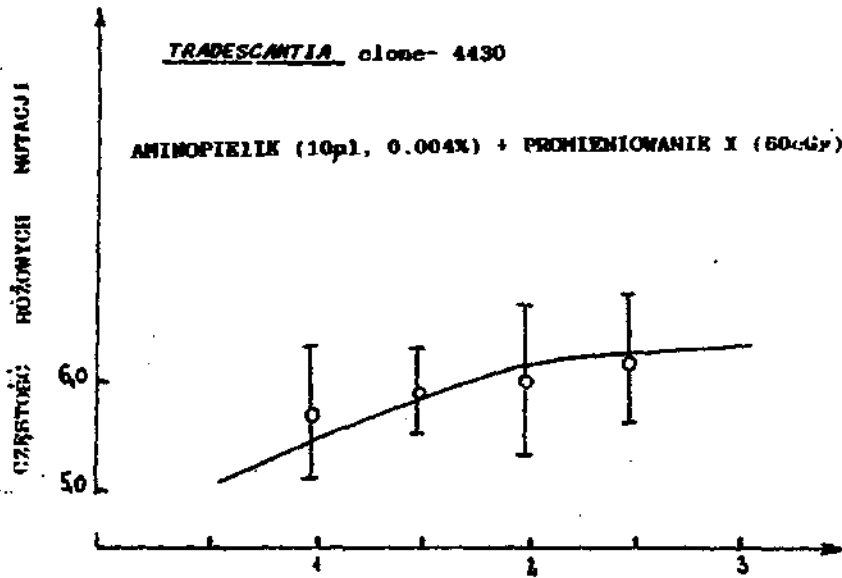
MATERIAŁ I METODY

Do badań nad współdziałaniem z promieniowaniem jonizującym wybrano: Aminopielik, Ambusz, Afalon, Ripcord, Decis i deltametrynę. Działanie tych preparatów na rośliny *Tradescantia* powodowało podwyższenie poziomu mutacji. Przycięte kwiatostany klonu *Tradescantia* 4430, traktowano poprzez injekcję do kwiatostanu, 10-ciu ul roztworu o odpowiednim stężeniu, a następnie po upływie określonego czasu napromieniano je promieniowaniem X, przy pomocy aparatu rentgenowskiego. Metodę eksperymentów, traktowania i napromieniania oraz prowadzenia hodowli *Tradescantia*, jak również metodę pomiaru mutacji przedstawiono szczegółowo w poprzednich opracowaniach (3).

W badaniach nad współdziałaniem Aminopielika z promieniowaniem ustalono, że wydłużenie powyżej dwóch godzin (RYS.1), przerwy pomiędzy injekcją roztworu a napromienianiem, nie wpływa już w sposób istotny na efekt współdziałania. W związku z tym w doświadczeniach mających zbadać efekt skojarzonego działania badanych czynników przestrzegano, żeby przerwa pomiędzy traktowaniem a napromienianiem wynosiła co najmniej 2 godziny.

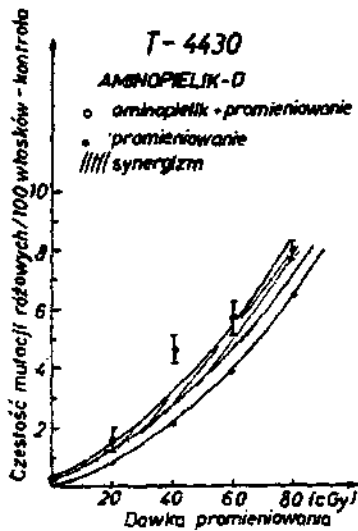
REZULTATY

Na rysunku 2 przedstawiono wyniki uzyskane w badaniach, w których zastosowano skojarzone traktowanie roślin Aminopielikiem oraz promieniowaniem X o różnych dawkach. Wartość częstości mutacji dla dawki równej zero, jest efektem indywidualnego działania roztworu, który traktowano wszystkie grupy roślin,



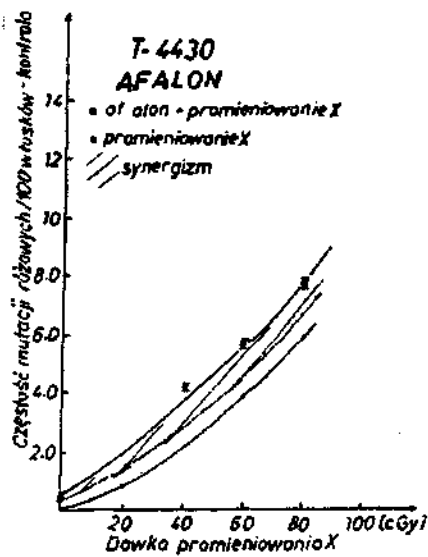
DŁUGOŚĆ PRZERWY POMIĘDZY TRAKTOWANIAMI

RYS.1. Zależność efektu końcowego skojarzonego traktowania Aminopielikiem i promieniowaniem, od długości przerwy pomiędzy traktowaniem chemicznym i napromieniowaniem.

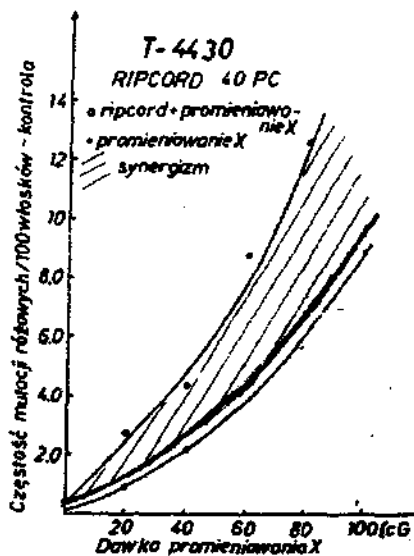


RYS.2. Zależność efektu synergistycznego od dawki promieniowania.

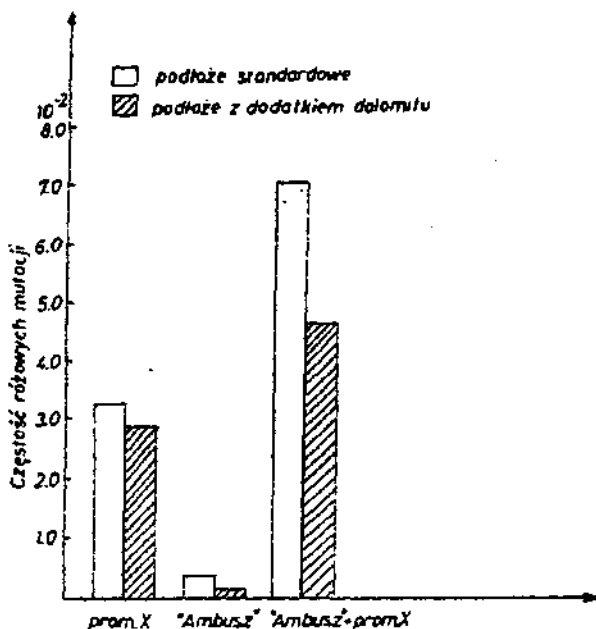
Dolna krzywa przedstawia zależność częstości mutacji u *Tradescantia* od dawki promieniowania X w przypadku indywidualnego działania promieniowania, natomiast górna krzywa, przedstawia efekt skojarzonego działania roztworu i promieniowania. Widać że dla niższych dawek efekt końcowy różni się niewiele od sumy indywidualnych efektów, ale dla dawek wyższych daje się zauważyć synergistyczne wzmożenie. Podobnie jest w przypadkach skojarzonych traktowań roztworami Afałonu i Ripcordu, oraz różnymi dawkami promieniowania X. Rezultaty tych badań przedstawiono na rysunku 3 i rysunku 4. Podobnie jak dla Aminopielika, górne krzywe przedstawiają wyniki skojarzonych traktowań: Afałona i różnymi dawkami promieniowania X (Rys.3.) i Ripcorda i różnymi dawkami promieniowania X (Rys.4.). Również dla wyższych dawek wartość synergistycznego efektu współdziałania (przebieg zakreskowa) wzrasta, z tym że dla Ripcordu synergizm jest wyraźnie widoczny dla całego zakresu dawek promieniowania. Należy tutaj również zwrócić uwagę na fakt, że od pewnego zakresu wartość efektu synergistycznego, czyli wartość zwiększenia częstości mutacji wynikająca ze współdziałania tych dwóch czynników przewyższa wartość efektu indywidualnego działania tego preparatu. Efekt ten jest wyraźny również w przypadku skojarzonego traktowania roślin *Tradescantia* roztworem preparatu Ambusz oraz promieniowaniem X o dawce 60 cGy. Częstość mutacji różowych indukowanych w koadrkach włosków precyków *Tradescantia* przez injekcję 10ul 0,005% roztworu Ambuszu wynosi 0,4 mut/ 100 włosków, częstość mutacji indukowanych przez promieniowanie wynosi 3,3 mut/ 100 włosków, natomiast częstość mutacji indukowanych w wyniku skojarzonego traktowania tym samym roztworem Ambuszu i napromieniowanych tą samą dawką promieniowania, wynosi 7,0 mut / 100



RYS.3. Zależność efektu synergistycznego od dawki promieniowania.

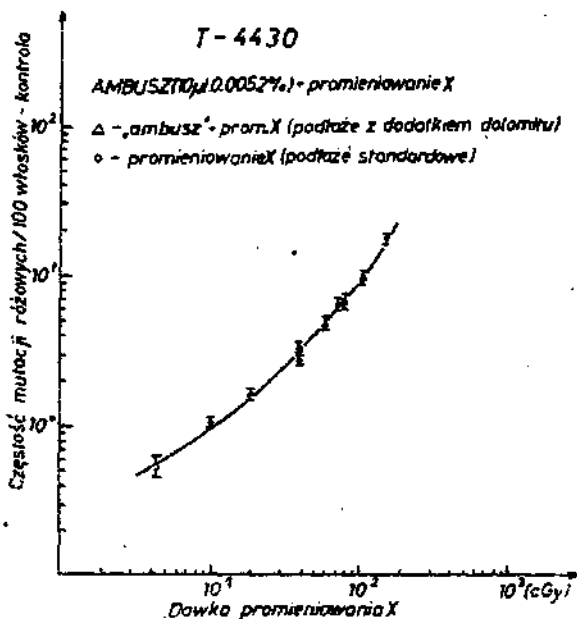


RYS.4. Zależność efektu synergistycznego od dawki promieniowania.



RYS.5. Częstość mutacji indukowana u *Tradescantia* niezależnym i skojarzonym działaniem Ambuszu i promieniowania włosków (Rys.5). Widać więc, że wartość synergistycznego wzmacnienia przewyższa wielokrotnie wartość efektu od czynnika chemicznego działającego w sposób niezależny.

Na rysunku 5 przedstawiono również rezultaty takich samych traktowań, ale wykonanych na roślinach rosnących na wzbogaconym w domieszkę dolomitową podłożu. We wcześniejszych badaniach stwierdzono, że takie wzbogacenie podłoża wpływa na wzrost radioodporności roślin⁽⁴⁾, prawdopodobnie powodowany stymulacją procesu naprawy uszkodzeń DNA. Dlatego też sprawdzono jak w takim składzie wygląda współdziałanie badanego środka ochrony roślin z promieniowaniem. Jak widać, rośliny rosnące na podłożu z domieszką dolomitową wykazują większą odporność i na promieniowanie i na mutagen, a także efekt



RYS. 6. Zależność dawka-efekt dla roślin z różnych podłoży, oraz traktowanych i nie traktowanych wstępnie Ambuszem.

synergistyczny jest bardzo wyraźnie mniejszy. Spostrzeżenie to potwierdzają rezultaty przedstawione na rysunku 6, na którym częstości mutacji indukowane skojarzonym traktowaniem Ambuszem i promieniowaniem, u roślin z podłoża dolomitowego nie wykazują synergistycznego wzmocnienia w stosunku do standardowej krzywej dawka-efekt.

Nie stwierdzono natomiast synergistycznego współdziałania w przypadku skojarzonego działania deltasmetryny i promieniowania (Rys. 7.). Wydaje się wręcz, że wstępne traktowanie roślin przez iniekcję roztworu, powoduje wyraźne zmniejszenie wrażliwości roślin na promieniowanie.

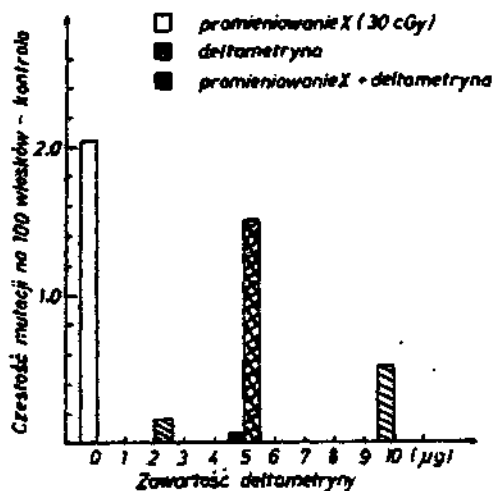
DYSKUSJA I WNIOSKI

Synergizm stwierdzono po skojarzeniu z promieniowaniem X traktowaniu roślin roztworami preparatów:

Aminopielik, Ambusz, Afalon, i Ripcord.

Jedną z prób wyjaśnienia mechanizmu współdziałania synergis-
tycznego jest teoria współdziałania na poziomie DNA, pomiędzy
promieniowaniem jonizującym i jakimkolwiek innym mutagenem lub
czynnikiem działającym na DNA opracowana przez H.P. Leenhouts'a i
K.H. Chadwick'a. W teorii tej, autorzy przyjmują, że zarówno
mutagen chemiczny działający na DNA jak i promieniowanie poza
uszkodzeniami, których skutki obserwujemy w postaci mutacji,
aberracji chromosomowych czy też śmierci komórki, wywołują również
subuszkodzenia spirali DNA, które to mogą być eliminowane w proce-
sach naprawy. W przypadku, gdy mutagen chemiczny i promieniowanie
działają łącznie, wtedy w wyniku koincydencji wywołanych przez nie
subuszkodzeń powstaje dodatkowo pewna ilość trwałych uszkodzeń
DNA. Liczba uszkodzeń powstających dodatkowo jest proporcjonalna do
całkowitej ekspozycji na promieniowanie i mutagen tzn. $N = \eta \cdot X \cdot D$
Przy czym η jest zawarte określone prawdopodobieństwo, że
subuszkodzenie, wywołane promieniowaniem o dawce D oraz wywołane
ekspozycją X mutagenu chemicznego dadzą w efekcie trwałe uszko-
dzenie DNA. Według autorów teorii w zakresie niskich dawek i mocy
dawek przy których duża część subuszkodzeń ulega naprawie efekt
synergistyczny odgrywa rolę dominującą zwiększając liczbę
efektywnych uszkodzeń DNA. Jest to wniosek bardzo ważny z punktu
widzenia ochrony środowiska, gdyż zarówno niskie dawki, jak i moce
dawek są charakterystyczne dla słabo jonizującego promieniowania,
występującego w środowisku naturalnym.

Silne powiązanie pomiędzy indukcją mutacji somatycznych a



RYS. 7. Częstość mutacji różowych indukowana różnymi traktowaniami deltametryną i promieniowaniem X

czynnika chemicznego działającego niezależnie, potęguje rolę zagrożeń wynikających z wprowadzania do środowiska naturalnego tych środków ochrony roślin, które działają również mutagennie. Niezwykle korzystnym natomiast zjawiskiem wydaje się być zaobserwowany ochronny wpływ na rośliny domieszek dolomitowych do podłoża. Jako środek dość często stosowany w rolnictwie mógłby odgrywać dodatkową rolę czynnika ochronnego. Dlatego wydaje się, że byłoby bardzo wskazane kontynuowanie badań w tym kierunku. Także odmienne niż innych środków współdziałanie deltametryny z promieniowaniem mogłoby sugerować obiecujące kombinacje traktowań, ale ten efekt zdecydowanie wymaga głębszych badań.

LITERATURA

1. Cebulska-Wasilewska A., Chadwick, K.H., Leenhouts H.F., (1981) Synergism between EMS and X rays for the induction of somatic mutations in *Tradescantia*, *Int. J. Radiat. Biol.* 40, 2, 163-173
2. Leenhouts H.F., Chadwick K., (1978) Analysis of synergistic sensitization, *Br. J. Cancer*, 37, supp. III, 198.
3. Cebulska-Wasilewska A., Mutacje somatyczne u *Tradescantia* jako układ modelowy do badania skutków czynników środowiskowych, IFJ, Kraków, Raport 1335/B, 1986.
4. Cebulska-Wasilewska A., Smagała J., Influence of the soil composition on the radiation induced mutation frequency in *Tradescantia*, *Nukleonika*, 33, 4-6, 127-137, 1986.

BADANIA WPLYWU MUTAGENNEGO DECISU I DELTAMETRYNY NA *TRADESCANTIA*

- AUTOMATYZACJA ZBIERANIA DANYCH

W. Wajda, A. Cebulska-Wasilewska

WSTĘP

Test oparty na pomiarze częstości mutacji somatycznych w komórkach włośkow precików kwiatowych niektórych odmian *Tradescantia* jest najczulszym spośród monitorów promieniowania jonizującego, wykorzystujących mutacje u roślin. Wprowadzony do kolekcji około 1958 roku przez prof. W.V. Browna z Uniwersytetu w Austin heterozygotyczny ze względu na barwę kwiatów klon T-02 już w 1960 roku został zaproponowany przez S. Ichikawę jako biologiczny monitor promieniowania do zastosowania w otoczeniu elektrowni jądrowych. Wykorzystanie tej metody w badaniach radiobiologicznych okazało się niezwykle cenne i zaowocowało uzyskaniem licznych wyników. Zbadano np. tą metodą skuteczność biologiczną różnych rodzajów promieniowania, zbadano zależność efektu promieniowania od parametrów biologicznych takich jak stopień ploidalności, zawartość DNA w komórce czy wielkość jądra i chromosomów. Sprawdzone wpływ mocy dawki i frakcjonowanie dawki na wielkość efektu, zbadano także zależność dawka-efekt w zakresie niskich dawek i mocy dawek. Stosując klon T-02 badano także efekt promieniowania kosmicznego. Test ten okazał się również wrażliwy na mutageny chemiczne. Niektóre z klonów znalazły zastosowanie w badaniach laboratoryjnych wielu różnych mutagenów chemicznych, a także w monitorowaniu środowiska. Do najczęściej wykorzystywanych możliwości metody należy pomiar częstości mutacji różowych i letalnych w komórkach włośkow precików *Tradescantia*. Szczegółowy opis hodowli rośliny jak i

metodyki pomiarowej przedstawiono we wcześniejszej pracy (1).

Biorąc jednak pod uwagę fakt, że metoda ta nie jest bardzo rozpowszechniona w Polsce, warto podkreślić jeszcze raz jej szczególnie użyteczne cechy.

Tradescantia jest rośliną długiego dnia i daje się łatwo prowadzić w zwykłej szklarni lub komorze wzrostowej. Zapewnienie plantacji 16-godzinne go cyklu świetlnego prowokuje ją do ciągłego kwitnienia. Oprócz niezaprzeczalnych zalet tego systemu do których należy zaliczyć prostotę, dostępność, ekonomiczność i szybkość jest jeszcze kilka innych cech które czynią ten model szczególnie cennym narzędziem badawczym:

- wiosek przeciętny przez swój rozwój może być porównywany z układem hodowli komórkowych,
- metoda daje możliwość badania dużej populacji komórek,
- w relatywnie krótkim czasie pozwala uzyskać informacje o indukowanych częstościach mutacji (przeciętnie po 2-3 tygodniach od ekspozycji)
- zależność częstości mutacji od dawki promieniowania przebiega zgodnie z dobrze opisanym modelem mutacji z supresją w populacji traktowanej
- znajomość modelu opisującego zależność efektu od dawki pozwala na głębszą i bardziej jednoznaczną analizę wpływu środowiskowych czynników modyfikujących efekt promieniowania,
- wrażliwość *Tradescantia* na promieniowanie jest bardzo wysoka, zbliżona do wrażliwości komórek ssaków (dawki rzędu 0.025 Gy wywołują już łatwo mierzalne efekty)
- kwiatostan zawierający upakowane pączki niewielkich rozmiarów znakomicie nadaje się do napromieniowania nawet małymi wiązkami promieniowania,

- duża ilość klonów *Tradescantia* pozwala dobierać je do badań w zależności od ich cech genotypowych i specyfiki badań,
- zarówno prowadzenie plantacji, jak i metoda pomiarów nie sprawiają żadnych trudności (do mierzenia mutacji wystarczy zwykła lupa binokularna),
- rośliny rosną dobrze w zwykłej szklarni, a warunki hodowli i fizjologia rośliny są szczegółowo poznane i opisane,
- rozmnażanie wegetatywne roślin zapewnia minimalną zmienność genetyczną.

Stosowanie metody nie wymaga żadnych skomplikowanych procedur, takich jakie na przykład są niezbędne w metodach opartych na sterylnych hodowliach kultur tkankowych. Do zalet metody należy również zaliczyć fakt, że znajomość szczegółowa zależności dawka-efekt dla promieniowania jonizującego, pozwala porównać efektywność mutagenną innych czynników środowiskowych i poprzez zastosowanie Rad-ekwiwalentu stworzyć wspólną bazę porównawczą dla różnych mutagenów. Mając na uwadze powyższe zalety metoda ta jest od wielu lat wykorzystywana w badaniach w Zakładzie Radiobiologii IFJ, a także w ramach prac prezentowanych w niniejszym opracowaniu do określenia mutagenności stosowanych w rolnictwie środków ochrony roślin. Niniejsza praca, na przykładzie badań nad mutagennością preparatu Decis i jego substancją aktywną deltametryną, prezentuje wyniki prac nad przyspieszeniem i automatyzacją zbierania oraz interpretacji danych.

System zbierania i analizy danych składa się z dwóch programów:

- programu TRADIN służącego do wczytywania danych
- programu TRADOUT służącego do analizy danych

Obydwa programy zostały napisane w dialekcie GFA Basic dla komputerów Atari ST.

Program TRADIN istnieje w dwóch wersjach - uproszczonej, przyjmującej dane z klawiatury, oraz podstawowej przyjmującej dane bezpośrednio ze stanowisk przy mikroskopach. Zliczane mutacje są wprowadzane bezpośrednio do komputera przez przyciśnięcie pedału i rejestrowane oddzielnie dla każdego rodzaju mutacji. Rejestrowane są trzy rodzaje mutacji więc stanowisko pracy wyposażone jest w cztery pedały - po jednym dla każdego rodzaju mutacji: różowych, pojedynczych i skróceń, oraz czwarty pedał wysyłający sygnały sterujące systemem.

System zbierania danych jest dostosowany do obsługi dwóch stanowisk pomiarowych z możliwością rozszerzenia maksymalnie do trzech. Każdy zestaw pedałów dołączony jest do jednego z gniazd manipulatora (joysticka) komputera Atari 520 ST. Wykorzystanie gniazd joysticków do wprowadzania sygnałów ze zliczania mutacji bardzo uprościło rozwiązania sprzętowe. Zbędne stało się wykorzystywanie specjalnych interfejsów i rozbudowanych układów elektronicznych w stanowiskach pomiarowych, co byłoby niezbędne przy stosowaniu gniazd transmisji szeregowej lub równoległej.

Obsługiwanie jednocześnie dwóch stanowisk pomiarowych stworzyło problemy związane z koniecznością synchronizacji działań obu osób liczących mutacje. Wstępne dane dla każdego punktu

pomiarowego są wprowadzane z klawiatury, po czym zliczane są mutacje przy wykorzystaniu stanowisk z pedałami. Po zakończeniu oglądania danego punktu pomiarowego musi być wprowadzona z klawiatury całkowita liczba oglądanych przecików, która jest nieznana z góry. Dlatego niemożliwe jest rozpoczęcie w jednym stanowisku zliczania mutacji dla następnego kodu gdy nie zostało jeszcze zakończone zliczanie poprzedniego kodu w drugim stanowisku. Z powyższych względów zaistniała konieczność sygnalizacji osobom liczącym przez system pewnych sytuacji, takich jak: potwierdzenie przyjęcia impulsu zliczanego, zakończenie zliczania w jednym stanowisku, przejście systemu w tryb korekty danych, zezwolenie na wprowadzanie następnego kodu - bez odrywania ich od okularów mikroskopu. Z tego powodu wykorzystanie ekranu monitora do przekazywania informacji osobom liczącym musiało zostać poważnie ograniczone i postanowiono wykorzystać do tego celu sygnały dźwiękowe. Ze względu na powyższe warunki komputer Atari 520 ST okazał się bardzo przydatny do tych celów gdyż posiada gniazda manipulatorów oraz rozbudowane możliwości generowania dźwięków. Użycie tego komputera do realizacji omawianego systemu pozwoliło zrealizować go znacznie mniejszym kosztem niż przy użyciu np. komputera klasy IBM PC.

Podstawowa wersja programu TRADIN przyjmuje dane z dwóch stanowisk pomiarowych wyposażonych w pedały. Po wprowadzeniu wstępnych danych z klawiatury, osoby mierzące przez przyciśnięcie pedałów wprowadzają zaobserwowane mutacje które są zliczane przez komputer. Przyjęcie każdego impulsu przez komputer jest potwierdzane krótkim sygnałem dźwiękowym który umożliwia kontrolę poprawności wprowadzenia. Każdy z trzech pedałów odpowiada jednemu rodzajowi mutacji - odpowiednio: różowe, pojedyncze i

skrócenia. Obydwa stanowiska mogą jednocześnie wprowadzać mutacje dla tego samego kodu odpowiadającego jednemu punktowi pomiarowemu w eksperymencie. Zakończenie wprowadzania dla danego kodu sygnalizowane jest przyciśnięciem czwartego pedału - sterującego. Po zakończeniu wprowadzania danych dla danego kodu przez obydwa stanowiska komputer przechodzi w tryb korekty/akceptacji danych, co jest również sygnalizowane odpowiednim sygnałem dźwiękowym. Można wtedy skorygować omyłkowo wprowadzone dane po czym po akceptacji danych dokonanej niezależnie z obu stanowisk komputer oblicza częstotści mutacji na 100 wiosków i zapisuje na dyskietkę, wraz z ilością wiosków i zliczoną liczbą mutacji. Taki system pracy zapewnia że w przypadku nagłego zaniku zasilania powtórzenia wymaga wyłącznie wprowadzenie danych dla jednego, aktualnie obserwowanego kodu. Jest to istotne, gdyż przeciki *Tradescantia* po zliczeniu mutacji dla jednego kodu są usuwane ze szkiełka podstawowego, a przechowywanie ich do końca dnia jest praktycznie niemożliwe.

Wyniki pomiarów są zapisywane na dyskietce równolegle w trzech zbiorach, osobno dla każdego rodzaju mutacji. Postać zbiorów jest następująca:

- ilość kodów (punktów pomiarowych);
- oznaczenie kodu;
- oznaczenie kodu;
- itd...
- znacznik dnia;
- numer dnia pomiarowego;
- znacznik kodu;
- oznaczenie kodu;
- częstość mutacji na 100 włosków;
- ilość zliczonych mutacji;
- ilość włosków;
- znacznik kodu;
- oznaczenie kodu;
- dane dla następnego kodu;
- itd. aż do końca dnia pomiarowego
- znacznik dnia;
- numer dnia pomiarowego;
- znacznik kodu;
- itd. dla następnych kodów
- znacznik dnia;
- numer następnego dnia pomiarowego;
- itd...

Taka organizacja zbiorów daje dwie korzyści:

- kolejne dni pomiarowe mogą być swobodnie dopisywane do końca istniejącego zbioru,
- program interpretujący wyniki może kontrolować poprawność zbiorów i dokonywać analiz wykorzystując np. tylko niektóre dni lub kody.

Sekwencyjna organizacja zbiorów zastosowano aby zapewnić uniwersalność i wymiennąść zbiorów w przyszłości dla różnych programów interpretujących a nawet dla różnych typów komputerów. Zastosowanie zbiorów o bezpośrednim dostępie utrudniłoby tę wymiennąść gdyż procedury obsługi takich zbiorów różnią się istotnie dla różnych języków programowania i dla różnych typów sprzętu komputerowego.

Oprócz omówionej pełnej wersji programu TRADIN istnieją też dwie inne wersje:

- obsługująca tylko jedno stanowisko pomiarowe, poza tym nie różniąc się od wersji omówionej,
- wersja uproszczona obsługująca wprowadzanie danych z klawiatury, stosowana gdy konieczne jest wprowadzenie danych zbieranych w sytuacjach wykluczających możliwość zastosowania komputera, lub całego starego eksperymentu gdzie ilości zliczonych mutacji są zapisane w dokumentacji.

Program TRADDOUT jest programem analizującym dane z eksperymentu i prezentującym wyniki. Wczytuje on jeden ze zbiorów utworzonych programem TRADIN i kontroluje jego poprawność. Po stwierdzeniu poprawności zbioru fada podania informacji czy ma analizować cały zbiór, czy tylko wyszczególnione dni. Program może wyliczać średnie częstotliwości mutacji używając średniej zwykłej lub ważonej. Program oblicza średnie częstotliwości mutacji na 100 włosków dla poszczególnych kodów (punktów pomiarowych) sumując dane po dniach oraz wylicza odchylenie standardowe. Program prezentuje wyniki w dwóch podstawowych formach: wydruku w postaci tabeli, oraz wykresu na ekranie - przy czym wykres może być przesłany na drukarkę w celu sporządzenia trwałej kopii.

W pierwszym przypadku tabela prezentuje dane dla wszystkich analizowanych punktów pomiarowych (patrz Tabela 1 i 2). W tym trybie możliwe jest także przeprowadzenie testu Studenta istotności różnic dla wybranych par średnich. Przykłady dla Decisu przedstawione pod tabelkami 1 i 2 prezentują zastosowanie tej funkcji programu. W trybie prezentowania wykresu pokazywany jest przebieg w czasie (dla poszczególnych dni) częstości mutacji dla wybranego kodu. Na żądanie wykres może być skopiowany graficznie na drukarce. Obejrzenie przebiegu w czasie częstości mutacji może być przydatne szczególnie w przypadku traktowania roślin mutagenami chemicznymi, dla których przebieg częstości mutacji w funkcji czasu jest odmienny niż w przypadku promieniowania, a także w celu analizy synergizmu działania mutagenu chemicznego i promieniowania jonizującego.

Poniżej przedstawiono wydruki wyników działania programu TRADOUT dla Decisu i Deltametryny, oraz kopie wykresów rysowanych przez program na ekranie. W tabelkach kody oznaczają numery punktów pomiarowych, wartości dla poszczególnych dni są częstościami mutacji na 100 włosków, średnia i odchylenie standardowe nie wymagają komentarza.

Znaczenia poszczególnych kodów są następujące:

- 1 -- Decis 0.1%, iniekcja 10 ul
- 2 -- Decis 0.03%, iniekcja 10 ul
- 3 -- Decis 0.06%, iniekcja 20 ul
- 4 -- Decis 0.01%, iniekcja 10 ul
- 5 -- Deltametryna, iniekcja 5 ug
- 6 -- Deltametryna, iniekcja 1 ug
- 7 -- Deltametryna, iniekcja 2 ug
- 8 -- Kontrola

Kody Decis : Deltaeteryna ---- mutacje rozowe
 dzien po naswietleniu

	11	12	13	14	15	średnia	s.dev.
1--->	0.3	0.1	0.1	0.3	---	0.206	0.0362
2--->	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.184	0.0344
3--->	0.1	0.4	---	0.1	---	0.211	0.0364
4--->	0.3	0.5	0.2	0.4	0.0	0.274	0.0392
5--->	0.3	1.6	0.3	0.3	0.3	0.551	0.0625
6--->	0.1	0.2	0.3	0.1	0.3	0.215	0.0436
7--->	0.0	0.5	0.4	0.5	0.8	0.457	0.0966
8--->	0.3	0.0	---	0.1	0.4	0.202	0.0327

 Kontrola istotnosci roznic srednich testem Studenta
 Kody 2 i 8

Srednie roznia sie z prawdopodobienstwem: 53.37 %
 Wartosc funkcji t Studenta: 0.7703
 Stopnie swobody: 7

 Kontrola istotnosci roznic srednich testem Studenta
 Kody 4 i 8

Srednie roznia sie z prawdopodobienstwem: 97.83 %
 Wartosc funkcji t Studenta: 2.9401
 Stopnie swobody: 7

 Kontrola istotnosci roznic srednich testem Studenta
 Kody 5 i 8

Srednie roznia sie z prawdopodobienstwem: 100.00 %
 Wartosc funkcji t Studenta: 10.0319
 Stopnie swobody: 7

 Kontrola istotnosci roznic srednich testem Studenta
 Kody 6 i 8

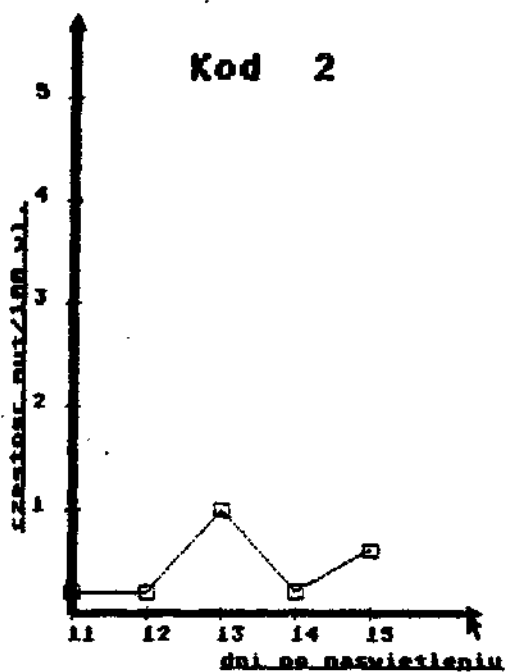
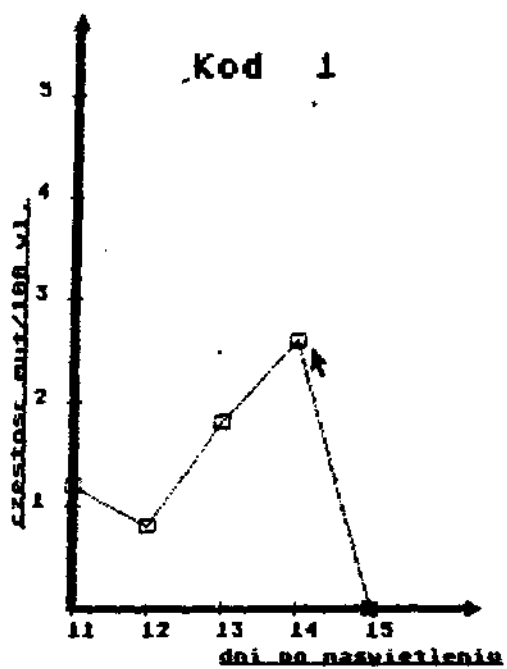
Srednie roznia sie z prawdopodobienstwem: 37.73 %
 Wartosc funkcji t Studenta: 0.5146
 Stopnie swobody: 7

 Kontrola istotnosci roznic srednich testem Studenta
 Kody 7 i 8

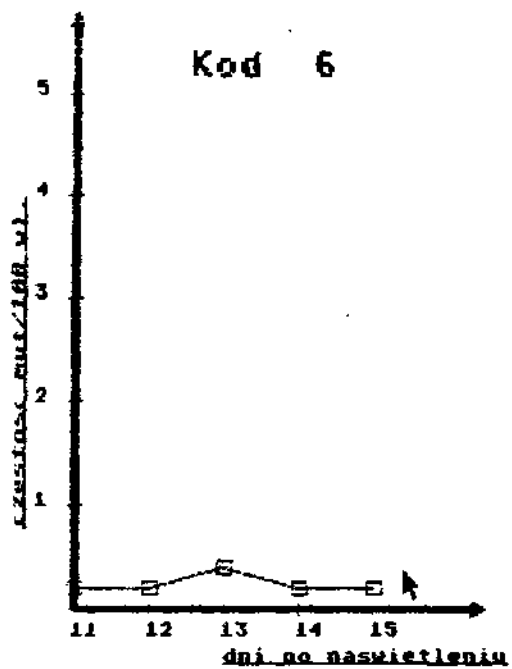
Srednie roznia sie z prawdopodobienstwem: 99.84 %
 Wartosc funkcji t Studenta: 4.9994
 Stopnie swobody: 7

 Kontrola istotności różnic średnich testem Studenta
 Kody 2 i 8
 Średnie różnice nie z prawdopodobieństwami: 74,00 %
 Wartość funkcji t Studenta: 1,2255
 Stopnie swobody: 7
 Kontrola istotności różnic średnich testem Studenta
 Kody 3 i 8
 Średnie różnice nie z prawdopodobieństwami: 97,16 %
 Wartość funkcji t Studenta: 3,0508
 Stopnie swobody: 5
 Kontrola istotności różnic średnich testem Studenta
 Kody 4 i 8
 Średnie różnice nie z prawdopodobieństwami: 98,34 %
 Wartość funkcji t Studenta: 3,1318
 Stopnie swobody: 7
 Kontrola istotności różnic średnich testem Studenta
 Kody 6 i 8
 Średnie różnice nie z prawdopodobieństwami: 97,39 %
 Wartość funkcji t Studenta: 2,8115
 Stopnie swobody: 7
 Kontrola istotności różnic średnich testem Studenta
 Kody 7 i 8
 Średnie różnice nie z prawdopodobieństwami: 100,00 %
 Wartość funkcji t Studenta: 18,9893
 Stopnie swobody: 7

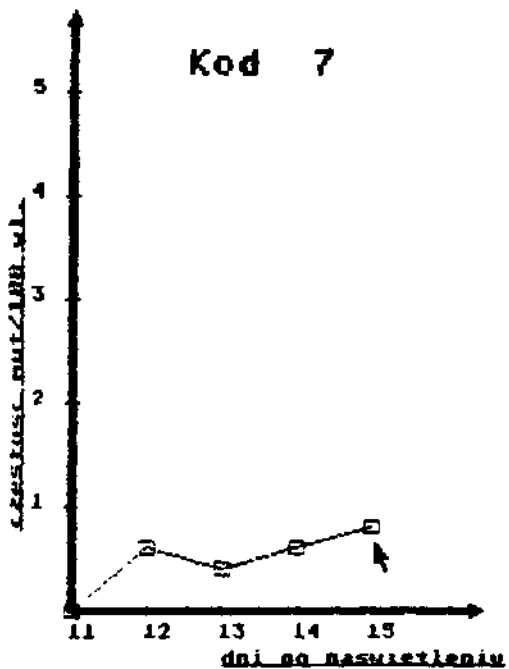
Kody	Delta	Skroścista	dział po namietleniu
1-->	1.31	0.71	1.71 2.71
2-->	0.31	0.21	1.01 0.51
3-->	0.41	0.21	0.71
4-->	0.01	0.31	0.61 1.11
5-->	0.31	1.61	3.11 0.21
6-->	0.51	0.81	0.11 0.21
7-->	0.81	0.81	3.01 0.81
8-->	0.31	0.21	0.11 1.31



Kod 6



Kod 7



Ponizej załączone są wydruki fragmentów programów.

Procedure Pedaly

Rem *** Obsługa pedaliw - wprowadzanie i poprawa ilości mutacji

Rem *** procedura obsługi joystickow z Atari GFA Basic ***

Fin1%=0

Fin2%=0

Tab%=Xbios(34)

W1%=Tab%+60

W2%=Tab%+61

Aa%=Chr\$(&H14)

Bb%=Chr\$(&H15)

Cc%=Chr\$(&H8)

X=Xbios(&H19,3,L:Varptr(Aa%))

Do

Joy1%=Peek(W1%)

Joy2%=Peek(W2%)

If Joy1%=8 Then

Fin1%=1

For Syg=1 To 4

Sound 1,15,2,2,4

Sound 1,15,2,3,4

Sound 1,0,0,0,0

Next Syg

Endif

If Joy2%=8 Then

Fin2%=1

For Syg=1 To 4

Sound 1,15,2,2,4

Sound 1,15,2,3,4

Sound 1,0,0,0,0

Next Syg

Endif

Exit If Fin1X=1 And Fin2X=1

If Joy1X=1 Or Joy2X=1 Then

Sound 1,15,2,7,5

Sound 1,0,1,1,10

P=P+Kroczek

Print At(10,4);" "

Print At(10,4);P

Endif

If Joy1X=2 Or Joy2X=2 Then

Sound 1,15,2,6,5

Sound 1,0,1,1,10

Sp=Sp+Kroczek

P=P+Kroczek

Print At(10,4);" "

Print At(20,4);" "

Print At(10,4);P

Print At(20,4);Sp

Endif

If Joy1X=4 Or Joy2X=4 Then

Sound 1,15,2,5,5

Sound 1,0,1,1,10

St=St+Kroczek

Print At(30,4);" "

Print At(30,4);St

Endif

Loop

X=Xbios(&H19,3,L;Varptr(Bb*))

X=Xbios(&H19,3,L;Varptr(Cc*))

Poke W1%,0

Poke W2%,0

Return

LITERATURA CYTOWANA

1. Cebulska-Wasilewska A., Mutacje somatyczne u *Tradescantia* jako układ modelowy do badania skutków czynników środowiskowych. IFJ, Kraków, Rap. 1335/B., 1986.
2. Nawrocki S., GFA-Basic. Stoleczny Ośrodek Techniki Obliczeniowej., Warszawa 1988.

ZASTOSOWANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH I WYMIAN SIOSTRZANYCH
CHROMATYD W LIMFOCYTACH KRWI LUDZKIEJ W OCENIE EFEKTYWNOŚCI
ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN

A. Wierzewska, E. Kasper, B. Krzykwa

WSTĘP.

Znane jest zjawisko uszkodzania nici DNA chromosomów poprzez działanie na żywe komórki promieniowania jonizującego. Efekt tego uszkodzenia można zaobserwować stosując do doświadczeń modelową hodowlę limfocytów krwi obwodowej człowieka, która poddano działaniu takiego promieniowania. Nówczas po zakończonej hodowli w preparatach cytogenetycznych widoczne są charakterystyczne aberracje chromosomowe. Są to chromosomy dicentryczne i koliste (ringi). Chromosomy dicentryczne powstają na skutek pęknięć dwóch chromosomów i ponownego wzajemnego połączenia się ich oraz chromosomy koliste powstają z jednego chromosomu o połączonych końcach. Te same aberracje chromosomowe mogą wystąpić w hodowlach limfocytów, do których dodano badanych substancji chemicznych podejrzanych o uszkodzające działanie nici DNA.

Jednak czulszą i lepszą metodą dla substancji chemicznych, które działałyby mutagennie na materiał genetyczny jest analiza wymian chromatyd siostrzanych (SCE). Są to wzajemne wymiany odcinków chromatyd w obrębie tego samego chromosomu, występujące w każdej żywej komórce. Pod wpływem działania środka chemicznego można zastać zwiększoną ilość tych wymian, co wykorzystano do badań nad oceną mutagenności różnych związków. Wymiany chromatyd siostrzanych można obserwować wówczas, gdy każda z chromatyd jednego chromosomu jest inaczej zabarwiona tj. jedna jest jasna, druga ciemna. Efekt taki uzyskuje się gdy do hodowli limfocytów

doda się 5-bromodeoxyurydyne (5-BrdU), która jako analog tyzydyny jest wbudowywana do nici DNA. Chromatydy mające wbudowaną 5-BrdU w obie nici DNA wiążą mniej barwnika Giemsy i są jasne, w przeciwieństwie do chromatydy, które wbudowują w jedną nici 5-BrdU są ciemne. Wzajemne wymiany między tymi chromatydami powodują przemienne wystąpienie odcinków jasnych i ciemnych na ich długości.

W niniejszej pracy przedstawiono rezultaty badań nad skutecznością indukowania aberracji chromosomowych i siostrzanych wymian chromatydowych, przez roztwory niektórych środków ochrony roślin. Biologiczne efekty działania tych preparatów porównano również z efektywnością indukowania tych samych zmian chromosomowych przez różne rodzaje promieniowania jonizującego.

MATERIAŁ I METODYKA.

Do wszystkich przeprowadzonych eksperymentów materiałem wziętą do badań była krew od dawców krwi w średnim wieku. Pełną krew pobierano do heparynizowanych naczyń szklanych i niezwłocznie napromieniowano w temperaturze pokojowej. Następnie zakładano hodowlę limfocytów, przenosząc napromienioną krew do nowych sterylnych naczyń z pożywką o składzie: 80% podłoża Eagle'a z antybiotykami, 20% surowicy cielęcej płodowej. Podziały limfocytów stymulowano preparatem LF-7 w ciągu 46 godzin.

Tak krótki czas hodowli wybrano w celu wzięcia do obserwacji wyłącznie komórek będących w pierwszym podziale mitotycznym. Po dodaniu do hodowli colcemidu w ilości 0,03 ug/ml kończono ją w sposób rutynowy. Preparaty barwiono roztworem Giemsy w buforze Sorensena i obserwowano aberracje chromosomowe w figurach mitotycznych pod imersją. Do obliczeń wzięto pod uwagę

występowanie chromosomów dicentrycznych i kolistnych.

Traktowanie chemiczne.

Traktowanie limfocytów krwi ludzkiej środkami ochrony roślin (Aminopielik i Decis) polegało na dodaniu do hodowli odpowiednich stężeń tych związków. W badaniach nad Aminopielikiem dodawano 1 μ l-3 μ l na 10ml hodowli natomiast w przypadku Decisu 0,02-0,04 μ l/10ml hodowli. Do odczytów SCE, hodowla prowadzona była przy obecności 5-BrdU, w ilości 5 μ g/ml przez 72 godz., w ciemności. Po sporządzeniu preparatów w sposób rutynowy, barwiono je fluorochromem Hoechst 33258 i nasświetlano promienionami UV. Następnie poddano działaniu wysokiej temperatury w roztworze buforowym i ostatecznie i ostatecznie barwiono barwnikiem Giemsy. Działanie to ma służyć do wzmocnienia zróżnicowanego barwienia chromatyd przy analizowaniu wymian chromatyc siostrzanych.

Napromienianie

Próbki krwi napromieniwano w sterylnych, heparynizowanych naczynkach szklanych, w temperaturze pokojowej, na aparaturze rentgenowskiej zlokalizowanej w pomieszczeniu cyklotronu U-120 w następujących warunkach: napięcie 250 kv, filtr 0,5 mm Cu, moc dawki 110 R/min.

Próbki krwi zostały napromienione pięcioma dawkami: 10, 20, 50, 75, 100 radów.

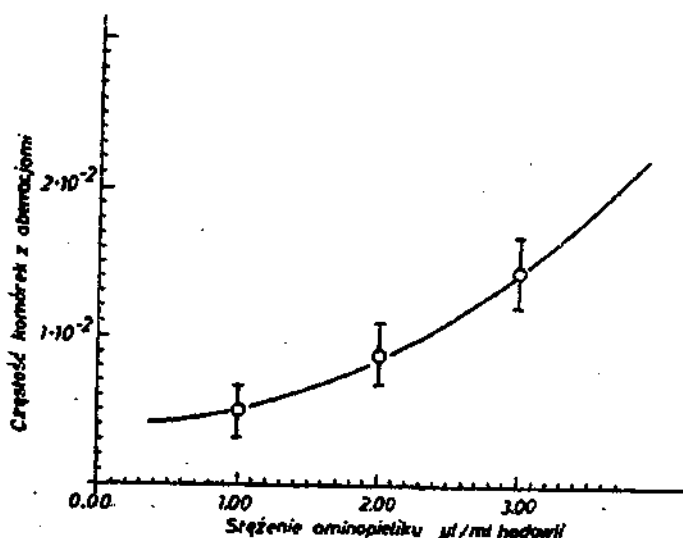
Do odczytów częstości aberracji chromosomowych limfocytów krwi dla promienionowania neutronowego, napromieniono również pięć próbek krwi następującymi dawkami: 40, 80, 120, 160, 200 radów, na cyklotronie U-120, będącym źródłem prędkich neutronów o średniej energii: 5.6 MeV.

REZULTATY.

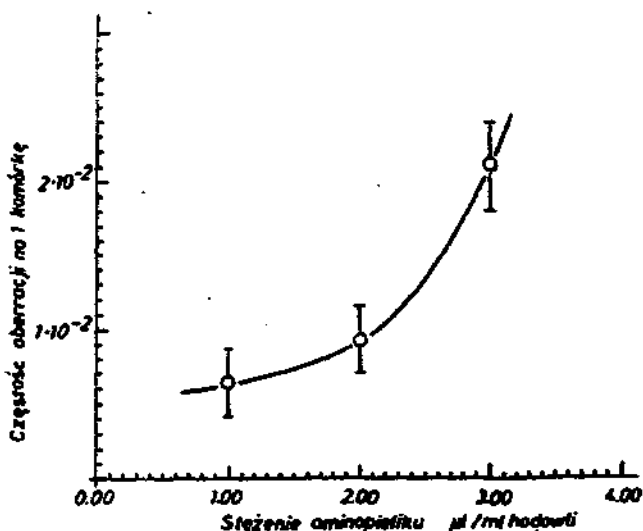
W trakcie badań nad preparatem Aminopielik 2.4 D - stwierdzono w jednej z uzyskanych trzydniowych hodowli limfocytów /po dodaniu do niej 2 ul preparatu o stężeniu handlowym/ na 216 dzielących się komórek - cztery aberracje chromosomowe limfocytów krwi.

Ponieważ u człowieka pojedyncze aberracje pojawiają się po zbadaniu od 3000 do 6000 komórek - wynik ten wydawał się wskazywać na mutagenność preparatu.

Na 6 hodowli, w których zastosowano Aminopielik 2.4 D - we wszystkich obserwowane były fragmentacje chromosomów, w czterech natomiast /2,4,5 i 6/ obserwowane były aberracje przyjęte jako kryterium mutagenności, tj. dicentriki i ringi. W jednej hodowli /dawca B.J./, w której udało się przeprowadzić obserwacje stosunkowo dużej, bo przekraczającej 2000 liczby komórek, zaobserwowano 24 komórki z aberracjami, w których pojawiło się ogółem 42 aberracje. Na rysunkach 1 i 2 przedstawiono zależność



RYB.1



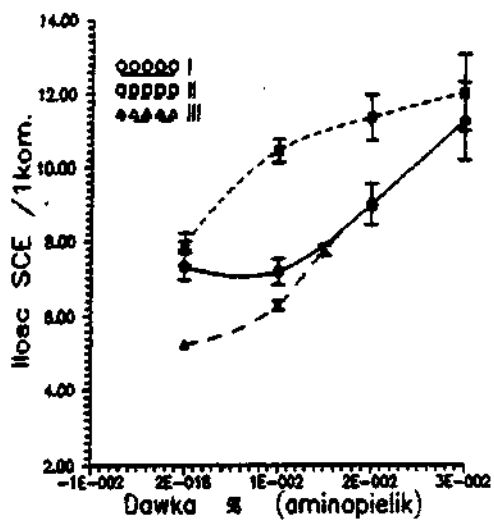
RYS.2

występowania aberracji w tej hodowli w układzie: efekt - stężenie roztworu. Widać z nich, że istnieje istotna zależność między występującą w populacji ilością komórek z aberracjami lub częstości aberracji a stężeniem.

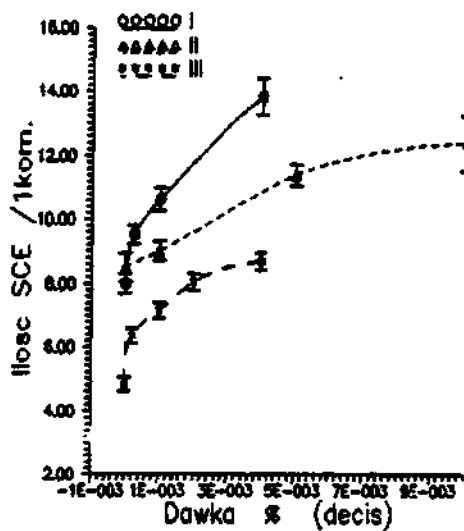
Rezultaty badań (wymiana chromatyd siostrzanych), nad genotoksycznym wpływem preparatu Aminopielik 2.4 D i Decis przedstawiono na wykresach 1 i 2.

Dla porównania efektów uzyskanych po traktowaniu limfocytów środkami ochrony roślin z efektami biologicznymi innego znanego mutagenu przeprowadzono badania wpływu promieniowania jonizującego na indukcję aberracji w komórkach limfocytów.

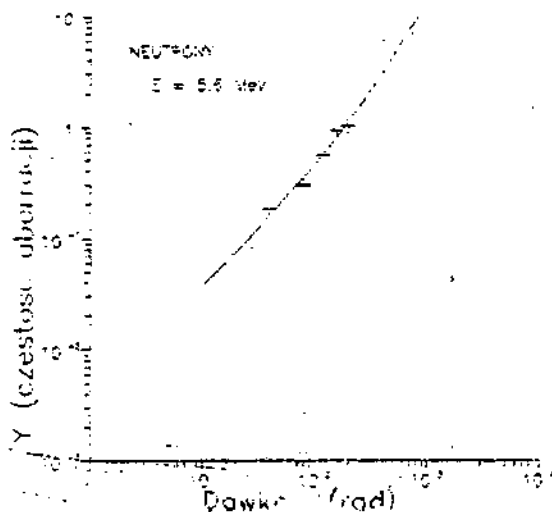
Rezultaty tych badań przedstawiono na rysunkach 3 - 5. Rysunek 3 przedstawia krzywą zależności y/x/ ilości aberracji na 1 komórkę w zależności od dawki dla promieniowania neutronowego, rysunek 4 krzywą zależności y/x/ ilości aberracji na 1 komórkę w zależności od dawki dla promieniowania rentgenowskiego. Natomiast rysunek 5 przedstawia porównanie krzywych zależności y/x/ ilości



WYKRES 1



WYKRES 2



Rys.3. Zależność między wielkością dawki a częstotliwością chromosomów dicentrycznych i kolistych w komórce dla promieniowania neutronowego.

aberracji na 1 komórkę od dawki dla promieniowania neutronowego i rentgenowskiego w układzie liniowym.

Błąd σ częstotliwości aberracji obliczony jest przy założeniu, że rozkład aberracji chromosomowych podlega rozkładowi Poissona. Odczytana z tabeli dawka jest maksymalnie prawdopodobną dawką równoważną na całe ciało. Jej przedział ufności określony jest przez fakt, iż rozkład aberracji jest wspomnianym wyżej rozkładem Poissona. Przedział ufności ustalono w tym przypadku na 95%.

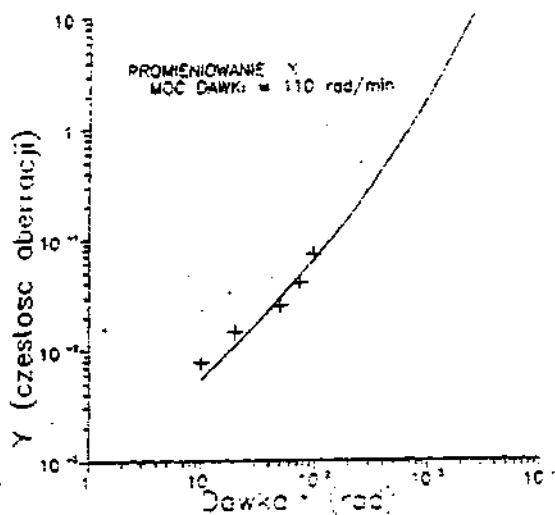
Dane o częstotliwości chromosomów dicentrycznych i chromosomów kolistych poddano dopasowaniu metodą najmniejszych kwadratów do równania:

$$y = \alpha D + \beta D^2$$

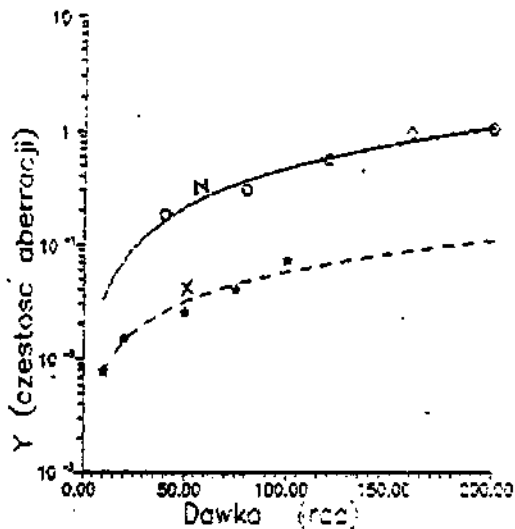
gdzie:

y - częstotliwość chromosomów dicentrycznych

α - parametr składowej liniowej



Rys.4. Zależność między wielkością dawki a częstością chromosomów dicentrycznych i kolistych w komórce dla promieniowania X



Rys.5. Wpływ promieniowania neutronowego i rentgenowskiego na liczbę aberracji dicentrycznych i kolistych w limfocytach krwi ludzkiej.

β . - parametr składowej kwadratowej

D - dawka

Obliczenie dokonano na komputerze IBM PC Xi przy użyciu programu MINUIT, służącego do minimalizacji funkcji wielu zmiennych.

W efekcie uzyskano następujące wartości parametrów α i β dla promieniowania neutronowego /cyklotron U-120 o średniej energii 5.6 MeV/

$$\alpha = 3.6 \times 10^{-8} \text{ rad}^{-1}$$

$$\beta = 9.3 \times 10^{-9} \text{ rad}^{-2}$$

Dla promieniowania rentgenowskiego o mocy dawki 110 rad/min.

$$\alpha = 5.3 \times 10^{-4} \text{ rad}^{-1}$$

$$\beta = 1.2 \times 10^{-6} \text{ rad}^{-2}$$

Porównując dawki promieniowania rentgenowskiego z dawkami neutronowymi dla arbitralnie przyjętego poziomu aberracji, można określić względną skuteczność biologiczną /MSB/ prędkich neutronów o średniej energii 5.6 MeV w stosunku do promieniowania rentgenowskiego. Na podstawie przeprowadzonego opracowania, oszacowano wartość MSB, przyjmując go równym stosunkowi dawek promieniowania rentgenowskiego i neutronowego dla częstości i aberracji na 1 komórkę:

$$\text{MSB} = \frac{D_x}{D_N} / \text{1 aberracji na 1 komórkę/}$$

Otrzymana wartość wynosi 3.8.

DYSKUSJA.

Porównując uzyskane zależności dla Aminopielika oraz Decisu z zależnością dla aberracji chromosomowych limfocytów krwi występujących po napromienieniu promieniowaniem X, można stwierdzić, że uzyskane dla stężenia 3 ul Aminopieliku 2,4 D na 1

mi ludowii: ilość dicentrików i ringów /22 na 1036 komórek/ oraz ilość komórek z aberracjami /15 na 1036/ odpowiada dawce promieniowania ok. 6 raddów /1/.

Należy stwierdzić, że czynnikiem różnicującym częstotliwość aberracji obserwowanych po mutagenie jest dawca krwi. Podatność na działanie mutagenu jest różna u różnych dawców.

Komentarza wymaga też sprawa partii związku /rok produkcji/, który był używany do badań. Największą ilość aberracji chromosomowych uzyskano stosując Aminopielik 2.4 D wyprodukowany w roku 1988, co zdecydowanie potwierdziły testy mikrobiologiczne, w których Aminopielik 2.4 - 1989 nie powodował mutacji. Nie powodował też mutacji czysty kwas 2.4 D.

Według niektórych autorów /2/, którzy zajmowali się mutagennością tego związku, czynnikiem powodującym mutacje jest jakaś domieszka, która dostaje się do preparatu w trakcie procesu technologicznego jego produkcji, lub powstaje w wyniku rozpadu elementów składowych preparatu. Tłumaczyłoby to różną mutagenność różną mutagenność różnych partii produkcyjnych Aminopieliku 2.4 D.

LITERATURA.

1. Bauchinger M., Koester L., Schmidt E., Dresop J., Streng B.: Chromosome Aberrations in Human lymphocytes induced by fission neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.*, No.5, 449-457, 1984.
2. Schwarzacher H.G., Wolf U.: *Methods in human cytogenetics*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1974.
3. Sharma A.K., Sharma A.: *Chromosome techniques*, Butterworths, London, Boston, Sydney, Wellington, Durban, Toronto 1980.
4. Ziemba-Zóltawska B., Bocian E., Rosiek O., and Sabliński J., Chromosome aberrations induced by low doses of X-rays in human lymphocytes in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* vol.37, No 2, 231-236, 1980.
5. Turkia T.E., and Jalal S.M., Increased rates of sister chromatid exchanges induced by the herbicide 2.4-D. *The Journal of Heredity* 76, 213-214, 1985.
6. Best R.G. and McKenzie W.H., Variable sister-chromatid exchange response in human lymphocytes exposed in vitro to gossypol acetic acid. *Mutation Research*, 206, 227-233, 1989.
7. Kohn P.H., Sister Chromatid Exchange in Cancer, *Annals of Clinical and Lab. Science*, Vol. 13, No 4, 1983.

WSTĘP

W Polsce, jak i na całym świecie stale zwiększa się liczba produkowanych związków należących do grupy środków ochrony roślin. Niezależnie od niewątpliwych korzyści płynących dla społeczeństw z podniesienia poziomu upraw, część tych związków stanowi równocześnie potencjalne zagrożenie dla środowiska i zdrowia człowieka. Niektóre z nich, bezpośrednio lub też ich pozostałości a także produkty ich biotransformacji, dostają się do wody, gleby i pasz, stanowiąc nieprzewidziane i niekontrolowane zagrożenie dla zwierząt i dla ludności. Ujemne skutki ich pojawienia się w środowisku mogą się objawić w postaci zwiększonej częstości indukowania rozwoju komórek rakowych, dziedzicznych uszkodzeń genetycznych, czy też nawet mogą być przyczyną tzw. dryftu genetycznego. Z tego powodu, szczególnej wagi nabierają badania, w wyniku których uzyskuje się nowe informacje odnośnie kancerogenności lub mutagenności popularnie stosowanych związków lub preparatów. W poszczególnych rozdziałach niniejszego opracowania przedstawiono rezultaty z wykonanych na różnych testach biologicznych badań nad mutagennością niektórych popularnie stosowanych w rolnictwie preparatów. Celem niniejszej pracy oraz podkreślenie paru wniosków istotnych dla ochrony środowiska czy też dalszych badań.

EFEKTYWNOŚĆ MUTAGENNA

Aktywność mutagenna stwierdzono dla preparatów:

- Afalon, i deltametryna w oparciu o pojedynczy test
- Decis w oparciu o dwa testy

- Aminopielik, Ambusz, w oparciu o trzy testy

Normowanie wielkości efektu mutagennego na poziomie 50% przeżywalności dla modelu mutacji barwnikowych *Chlorella vulgaris* pozwala ułożyć następujący szereg mutagennej aktywności badanych czynników:

Promieniowanie > EMS > Aminopielik 88 > Ambusz >> pozostałe ~0
Analogiczne normowanie na modelu mutacji mitochondrialnych u *Saccharomyces cerevisiae* pozwala z kolei ułożyć następujący szereg tych samych czynników:

Ambusz promieniowanie > Aminopielik > Akrydyna >> pozostałe ~0
Jeszcze bardziej szczegółowy szereg mutagennej aktywności uzyskuje się w oparciu o rezultaty uzyskane dla mutacji somatycznych u *Tradescantia*:

Promieniowanie X > Ripcord > Afalon (przestarzały) > EMS > deltametryna > Aminopielik 88 > Ambusz > Afalon (świeży) > Aminopielik 89 > Decis

Nprawdzie tak przedstawione aktywności pozwalają tylko na jakościowe oszacowanie uzyskanych rezultatów, niemniej jednak niepokojącymi w tych rezultatach są dwa fakty:

- w pewnych układach biologicznych środki będące w powszechnym użyciu mogą być bardziej mutagenne niż znane silne mutageny (zależności podkreślone w przedstawionych powyżej szeregach),
- niektóre ze stosowanych środków wykazują bardzo silną zmienność w aktywności mutagennej w zależności od daty produkcji: czyli od technologii (w przypadku Aminopielika taką niestabilność potwierdziły wszystkie zastosowane testy włączając w to aberracje chromosomowe indukowane w limfocytach krwi ludzkiej), względnie wykazują niestabilność roztworów stosowanych preparatów (Afalon), a zatem wskazując na możliwość zagrożenia wynikającego

Tabela 1

Wartości Rad - ekwiwalentów uzyskanych dla preparatów badanych na test indukowania mutacji somatycznych u *Tradescantia*

Preparat	Ekspozycja	Częstość	Rad-ekw.
		mut/100 wł	cGy
Promieniowanie X	1cGy	0,045	1,0 (rad)
EMS	20ul-0,045%	0,60	13,3
Aminopielik 88	10ul-0,004%	0,30	6,7
Aminopielik 89	10ul-0,004%	0,24	5,3
Afalon (2)	10ul-0,003%	0,27	7,3
Afalon (0)	10ul-0,003%	0,33	6,0
Ambusz	10ul-0,005%	0,30	6,7
Decis	10ul-0,1%	0,01	0,2
Deltametryna	2ug w 10ul DMSO	0,26	5,8

z degradacji stosowanego preparatu w środowisku naturalnym.

Jeszcze bardziej niepokojące wydają się być wnioski wynikające z próby przybliżonego szacowania ilościowego ryzyka wynikającego z mutagenności tych preparatów. Takie przybliżone szacowanie opiera się na porównaniu skutków biologicznych obserwowanych pod wpływem działania tych preparatów, ze skutkami wywołanymi w tym samym układzie przez promieniowanie jonizujące. W tabeli 1 przedstawiono wartości Rad- ekwiwalentu uzyskane w oparciu o dane prezentowane dla *Tradescantia*. Jeżeli weźmiemy pod uwagę, że w przypadku promieniowania jonizującego dopuszczalna granica rocznego narażenia ludności na promieniowanie wynosi 0,5 rem, co odpowiada efektowi biologicznemu promieniowania o dawce pochłoniętej 0,5 cGy (rad), to wyniki te wskazują na rzeczywiste zagrożenie środowiska. Zagrożenie wynikające z

wprowadzenia lud obecności tych preparatów w środowisku jest nieporównywalne w żadnej mierze z zagrożeniem jakie wynika dla człowieka z jego nieuniknionego kontaktu z promieniowaniem jonizującym. Dramatyzm tych cyfr jeszcze bardziej podkreśla fakt, że jak wykazano w pracy na temat współdziałania tych czynników z promieniowaniem jonizującym w środowisku można się również spodziewać synergistycznego wzmocnienia, mutagennej aktywności tych preparatów.

WNIOSKI

Uzyskane rezultaty wykazują po pierwsze przydatność wybranych metod do oceny efektywności mutagennej preparatów badanych, po drugie celowość zastosowania kilku testów zamiast jednego, którego np. negatywna odpowiedź nie wyklucza całkowicie mutagennej aktywności tego preparatu w innym teście

Badania wykazały, że preparaty zarówno typu chwastobójczego takie jak Aminopielik jak i owadobójczego jak Ambusz mogą być efektywnymi mutagenami i to w zakresie stężeń zbliżonych do stężeń stosowanych w praktyce rolniczej. Aktywność mutagenna tych preparatów stwierdzono zarówno na prostych układach roślinnych jak *Chlorella vulg.* jak również u roślin wyższych jak *Tradescantia*.

W oparciu o uzyskane rezultaty wydaje się, że powinno się zalecać stosowanie w praktyce rolniczej, jeżeli to jest możliwe preparatów typu Decis 2,5 EC zamiast preparatu Ambusz 25 EC.

Należy podkreślić fakt, że w przypadku badanych środków ochrony roślin w układach opartych na *Chlorella vulg.* oraz *Saccharomyces cerev.* efekty są obserwowane już przy zastosowaniu środków o stężeniach zbliżonych do stosowanych w praktyce natomiast efekty mutagennego działania promieniowania obserwowane

są tylko po bardzo wysokich dawkach (10 krad *Saccharomyces cerev.*, 20krad *Chlorella vulg.*). W zasadzie ekspozycja całego człowieka na dawki promieniowania przekraczające 100 radów grozi śmiercią, natomiast dawki promieniowania wynikające z ekspozycji na występujące w środowisku źródła promieniowania są rzędu miliradów na rok. Czyli nawet tysiąckrotnie wyższe dawki promieniowania niż dawki występujące w środowisku nie mogłyby wywołać obserwowalnego efektu mutagennego u *Chlorella vulg.* oraz u *Saccharomyces cerev.*. Można zatem przypuszczać, że mutagenne właściwości środków ochrony roślin mogą stanowić istotne zagrożenie genotoksyczne dla środowiska naturalnego nieporównywalnie większe niż ryzyko wynikające z nieuchronnego kontaktu człowieka z obecnym w środowisku promieniowaniem jonizującym. Przypuszczenie takie wyraźnie popierają rezultaty odnośnie mutagenności badanych preparatów uzyskane dla *Tradescantia*. Test ten ma wrażliwość na promieniowanie zbliżoną do wrażliwości limfocytów ludzkich. W konsekwencji wydaje się że byłoby wskazane kontynuowanie dalszych badań z uwzględnieniem następujących kierunków:

- poszerzenia możliwości korzystania z całej baterii testów we wszystkich przypadkach badanych preparatów, albo przynajmniej tych, dla których zostanie uzyskana odpowiedź pozytywna dla najczulszego testu tzn *Tradescantia*
- badanie preparatów oraz ich czystych substancji biologicznie aktywnych jeszcze przed wprowadzaniem preparatów użytkowych na rynek.
- opracowanie modelu matematycznego opisującego zależność dawka efekt u *Chlorella vulg.* oraz *Saccharomyces cerev.*, pozwalającego na ekstrapolację danych z zakresu dawek wysokich do niskich. Taka

ekstrapolacja w konsekwencji dałaby możliwość zastosowania koncepcji szacowania ryzyka genotoksycznego na podstawie Rad ekwiwalentu w oparciu o dane eksperymentalne z wszystkich stosowanych modeli.

PODZIĘKOWANIE

W imieniu wszystkich współautorów niniejszego opracowania pragnę gorąco podziękować naszym koleżankom i kolegom z Działu Elektroniki oraz z Zakładu XI, a szczególnie Joli Adaszczyk za pomoc w naszych badaniach i rzetelność w pomiarach, które w ograniczonym stopniu przyczyniły się do osiągnięcia naszego celu.

A. Cebuliska-Wasilewska

AUTORZY TEKSTÓW:

ANTONINA CEBULSKA-WASILEWSKA

Zakład Radiobiologii,

Instytut Fizyki Jądrowej, ul. Radzikowskiego 152, 31-342 KRAKÓW

JERZY HUCZKOWSKI

Zakład Radiobiologii,

Instytut Fizyki Jądrowej, ul. Radzikowskiego 152, 31-342 KRAKÓW

ENA KASPER

Zakład Radiobiologii,

Instytut Fizyki Jądrowej, ul. Radzikowskiego 152, 31-342 KRAKÓW

BOGUSŁAWA KRZYKWA

Laboratorium Cytologii, Instytut Pediatrii, ul. Wielicka, KRAKÓW

STANISŁAW MACUBOWSKI

Krakowska Stacja Kwarantanny i Ochrony Roślin, ul. Kołowa 3, KRAKÓW

HENRYK PŁUCIENNIK

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Pasteura 1, WARSZAWA

JANUSI SMAGAŁA

Zakład Radiobiologii,

Instytut Fizyki Jądrowej, ul. Radzikowskiego 152, 31-342 KRAKÓW

STANISŁAW SMOLINSKI

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Pasteura 1, WARSZAWA

WITOLD WAJDA

Zakład Radiobiologii,

Instytut Fizyki Jądrowej, ul. Radzikowskiego 152, 31-342 KRAKÓW

ANNA WIERZEWSKA

Zakład Radiobiologii,

Instytut Fizyki Jądrowej, ul. Radzikowskiego 152, 31-342 KRAKÓW