

8. Archer J. E. Adrenocortical response to olfactory stimuli in male mice. — *J. Mammal.*, 1969, v. 50, p. 836—841.
9. Bateson P. How do sensitive periods arise and what are they for? — *Anim. Behav.*, 1979, v. 27, p. 470—486.
10. Bronson F. H. Rodent pheromones. — *Biol. Reprod.*, 1971, v. 4, p. 334—357.
11. Bruce H. M. An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. — *Nature*, 1959, v. 184, p. 105.
12. Drickamer L. G. Delay of sexual maturation in female house mice by exposure to grouped females or urine from grouped females. — *J. Reprod. Fert.*, 1977, v. 51, p. 77—81.
13. Drickamer L. C. Acceleration and delay of first estrus in wild *Mus musculus*. — *J. Mammal.*, 1979, v. 60, p. 215—216.
14. Drickamer L. C., Murphy R. X., Jr. Female mouse maturation: effects of excreted and bladder urine from juvenile and adult males. — *Develop. Psychobiol.*, 1978, v. 11, p. 63—72.
15. Dyer D. P., Jr., Southwick C. H. A possible sensitive period for juvenile socialization in mice. — *Behav. Biol.*, 1974, v. 12, p. 551—558.
16. Evans H. J., Breckon G., Ford C. E. An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. — *Cytogenetics*, 1964, v. 32, N 3, p. 289—294.
17. Hoppe P. C. Genetic and endocrine studies of the pregnancy blocking pheromone of mice. — *J. Reprod. Fert.*, 1975, v. 45, p. 109—115.
18. Shire J. G. M., Bartke A. Strain differences in testicular weight and spermatogenesis with special reference to C57BL/10J and DBA/2J mice. — *J. Endocrinol.*, 1972, v. 55, p. 163—171.
19. Southwick C. H. Eosinophil responses of C57BR mice to behavioral disturbance. — *Ecology*, 1959, v. 40, p. 156—157.
20. Whitten W. K. Genetic variation of olfactory function in reproduction. — *J. Reprod. Fert.*, 1973, Suppl. 19, p. 405—410.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ МУТАГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В ГИДРОСФЕРЕ

К. В. КВИТКО, И. Н. МАТОУШКОВА

Выявление (с целью изъятия из обращения) потенциально опасных, мутагенных, загрязнений должно осуществляться сейчас с помощью надежной генетической системы, обеспечивающей оценку их мутагенности и непрерывное слежение за генетическим здоровьем популяций (мониторинг). Оценка осуществляется чаще всего с помощью микроорганизмов, но пока лишь гетеротрофных, таких, как бактерии (кишечная палочка, сальмонелла) и грибы (неуроспора, аспергилл и пекарские дрожжи) [8]. Это дает возможность прогнозировать мутабельность прокариотических организмов, а из множества эукариотических микробов выбраны лишь аскомицеты, клетки которых имеют не типичный цитоскелет, а упрощенный его вариант, без центриолей и жгутиков; кроме того, эти организмы — типичные гетеротрофы. Тем самым генетические повреждения, приводящие к нарушению функций фотосинтеза и функций движения клеток, выпадают из поля зрения при оценке генетического груза в популяциях одноклеточных организмов.

Сложившаяся практика мониторинга основывается на упрощенном представлении о преобладании прямого химического действия загрязнений среды на клетки. Это, на наш взгляд, справедливо лишь для первичных продуцентов и в первую очередь для водорослей. Одноклеточные водоросли — повсеместно распространенные организмы, обитатели гидросферы в расширенном понимании этого термина (по В. И. Вернадскому, сюда относятся не только водоемы, но и все стоки — назем-

ные, подземные и атмосферные). Гидросфера — не только основная часть биосферы, но и основной аккумулятор загрязнений, ибо в нее переходит все смываемое загрязнение суши и воздуха. Учитывая, что наша основная задача — обеспечение «генетического здоровья биосферы», набор микробных тест-объектов мониторинга следует дополнить, введя генетически изученные водоросли.

Генетический мониторинг популяций водорослей важен, так как лишь при активном участии их в экосистемах обеспечиваются кислородом и пищей все гетеротрофные звенья. Водоросли могут накапливать загрязнения (ионы металлов) с большей скоростью, чем другие гидробионты [26, 6, 46], поэтому даже очень малые дозы ядов и мутагенов могут оказать эффект как на самые водоросли, так и на гетеротрофов — потребителей биомассы водорослей. Для них опасность загрязнений опосредована в той мере, в какой они связаны пищевыми цепями.

В ходе эволюции биосферы загрязнение продуктами минерального происхождения (прежде всего углекислотой и другими окислами биогенных элементов) возникало неоднократно при усилении вулканической деятельности в литосфере. Соответственно активировался фотосинтез и происходило захоронение загрязнений в виде ископаемого топлива [2].

Специфика современного, антропогенного типа загрязнений в том, что: а) увеличена доля органических соединений, большей частью это новые для биосферы вещества, эффект которых непредсказуем и этим опасен; б) из-за интенсивной траты ископаемого топлива появились в более высокой концентрации и в новых соотношениях минеральные загрязнения прошлых эпох (тяжелые металлы, изотопы биогенных элементов, кислоты и щелочи); в) из-за усиленного изъятия урожая в полях, водоемах и лесах, а также в результате рассеивания при резко возросшей добыче минералов нарушен возврат веществ в сложившихся системах. Все это приводит к эскалации передачи генетического нездоровья в биосфере от фототрофов к гетеротрофам и далее в пищевых цепях.

В этой связи простая оценка мутагенности недостаточна; необходимо осуществлять типирование мутагенов, т. е. прогнозирование их эффекта для молекулярного, клеточного, популяционного и биосферического уровней. Термин «мутагенотипирование», предложенный С. Г. Инге-Венцовым и Н. Н. Хромовым-Борисовым, подразумевает оперирование комплексом «методов, тест-объектов и эталонных мутагенов для оценки активности и специфичности мутагенов и для оценки молекулярной природы мутаций» [30], иначе говоря — создание штаммов с четкой реакцией на известные мутагены и испытание «неизвестных препаратов, поиски среди них аналогов эталонных мутагенов» [22].

Мы различаем типирование загрязнений как народнохозяйственную задачу и типирование тест-объектов как этап на пути к созданию генетических средств выполнения этой задачи.

## 1. ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ АЛЬГОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МУТАГЕНОТИПИРОВАНИЯ

Среди одноклеточных эукариотических водорослей генетически изучены представители зеленых водорослей родов *Chlorella*, *Scenedesmus* и *Chlamydomonas* [32, 4, 5, 13, 14, 48, 49, 50, 24, 43, 42]. По глубине и полноте генетической изученности на первое место мы должны поставить линии 137С хламидомонады. Эти линии широко используются в

качестве модельного объекта молекулярно-биологических и генетических исследований [47]. У агамных организмов, подобных хлорелле, генетическое изучение ограничено областью мутационного анализа [14], для хламидомонад возможно осуществление полного цикла генетического анализа, включающего гибридологическое изучение наследования. У сценедесмуса описан половой процесс, но в лабораторных условиях весь цикл размножения пока не удается воспроизвести [40]. Мы предлагаем создавать альгологическую систему мутагенотипирования на основе комбинации типированных штаммов по меньшей мере двух объектов: хлорелла (или сценедесмус как морфологически легко тестируемый в природных условиях представитель протококковых) и хламидомонада, подвижная, фототрофная водоросль, линии 137С которой представляют собой практически готовый набор форм для мутагенотипирования. Сочетание относительно просто устроенных протококковых водорослей с представителем вольвоксовых — хламидомонадой, обладающей наиболее полным набором органелл эукариотической клетки (хлоропласт с глазком и пиреноидом; хондриом; цитоскелет из жгутикового аппарата, базальных тел, «корней» и связок, веретена деления; две пульсирующие вакуоли и другие органеллы), позволит использовать как экспресс-методы тестирования токсичности, так и стандартные методы микробной генетики и тем самым избежать ошибок, обусловленных специфичностью реакций отдельного объекта.

Вместе с тем эти объекты объединены рядом черт, отражающих своеобразие зеленых водорослей как первичных продуцентов эукариотической уровня организации:

1) полнота набора генофоров (уникальный — геном и множественные копии — хондриом, пластом);

2) полнота набора типов питания (фото-, миксо- и гетеротрофность);

3) множественная детерминация фототрофности, что делает признаки хлоропласта удобными маркерами при интегральном учете мутабельности;

4) преобладание гаплоидной стадии в жизненном цикле, что позволяет использовать понятия теории митоза в оценке частот мутаций в уникальных наборах хромосом и во множественных наборах оргanelльных генофоров.

Если учесть, что в клеточном цикле (рис. 1) наблюдается четкая циркадная ритмика периодов синтеза различных фракций ДНК: ядра ( $\alpha$ ), ядрышка ( $\gamma$ ), пластыди ( $\beta$ ) и митохондрий ( $m$ ), то временная характеристика мутационного процесса в отдельных генофорах клетки может быть смоделирована достаточно близко к реальной ситуации в клетке.

Невозможность детального описания разнообразия хромосом зеленых водорослей с помощью световой микроскопии (недостаток, свойственный всем микробным тест-объектам) до определенной степени компенсируется возможностью регистрировать выщепление летальных мутаций в потомстве (рис. 1), устанавливать ход митотического распределения генофоров при анализе клеточных родословных (педигри) и реконструировать ход мейоза при тетрадном анализе.

Убиквизм — повсеместность распространения (в почве, в пресных и соленых водах, в обрастаниях на твердых субстратах) и космополитизм представителей родов *Scenedesmus*, *Chlorella* и *Chlamydomonas* сделают эти водоросли крайне удобными для осуществления генетического мониторинга популяций первичных продуцентов практически в любых регионах нашей страны и планеты в целом.

По отдельности каждый из этих объектов уже был использован

для осуществления скрининга: как агамная водоросль хлорелла [4, 5, 16], так и классический генетический объект — хламидомонада линии 137С [55, 54, 51, 52, 38, 28]. В этих работах использованы приемы тестирования мутагенности радиации и химических препаратов, отработанные в предыдущих исследованиях.

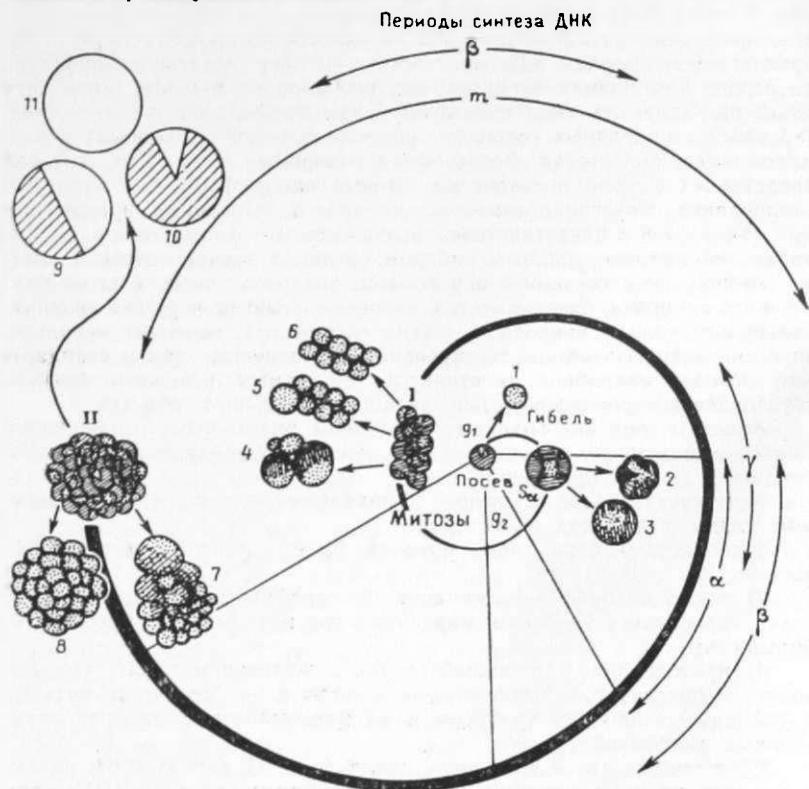


Рис. 1. Последовательность моментов репликации генофоров хлоропласта ( $\beta$ -ДНК), митохондрии ( $m$ -ДНК), ядрышка ( $\gamma$ -ДНК) и ядра ( $\alpha$ -ДНК) в циркадном клеточном цикле в сопоставлении с событиями — результатом действия мутагена на автоспору хлореллы перед посевом на плотные среды.

Типы повреждений: 1 — немедленная гибель, 2–3 — гибель в середине цикла I споруляции, 4, 5, 6 — гибель после I споруляции, 7–8 — гибель во II споруляции (I и II — нормальные микроколонии в двух первых споруляциях), 9, 10 — секторные макроколонии, 11 — мутантная колония. Периоды митотического цикла:  $g_1$  — пресинтетический,  $g_2$  — синтез ядерной ДНК,  $g_3$  — постсинтетический; митозы завершают единичный цикл на протяжении двух споруляций (I и II), изображенных в виде отрезка «спирали поколений»; наблюдаемые типы гибели соответствуют летальным мутациям, реализуемым с той или иной задержкой (по: Шевченко [31, 32], модифицировано).

**1. Агамные водоросли (хлорелла).** Впервые в нашей стране в качестве тест-объекта хлорелла была использована К. В. Квитко, И. А. Захаровым и Б. П. Хроповой для тестирования генетического эффекта УФ-лучей, рентгеновского излучения и химмутагенов [29], а затем для более детального анализа мутационного процесса у водорослей [4, 5, 31, 32].

Для экспериментов чаще всего используются автоспоры (рис. 1), представляющие собой однородную совокупность клеток, находящихся

на предсинтетической стадии ( $g_1$ ) митотического цикла, когда все клетки имеют один геном и минимальное число копий других фракций ДНК. Последствия воздействия мутагена в этот момент могут проявиться не только в первом клеточном цикле, но и в следующем цикле, в так называемой «второй споруляции» (рис. 1). Это проявляется в характерных нарушениях морфологии микроколоний (типы 1—8), гибели спор или задержках деления. Соответственно можно использовать следующие критерии: 1) летальный эффект, 2) сроки гибели (от гибели под лучом до гибели во второй споруляции, после двух цитокinesis), 3) влияние на митоз (по изменению числа автоспор), 4) влияние на длительность клеточных циклов, 5) частота нарушения эквивалентности автоспорообразования, 6) частота мутирования по пигментации и морфологии колоний и, наконец, интегральный показатель «скорость роста колоний», устанавливаемый по диаметру их.

Для учета этих изменений годится практически любой штамм, клетки которого делятся на 2, 4, 8, 16 равных спор. Это делает возможным использовать тест для мониторинга природных популяций в моменты массового размножения водорослей. Учет разнообразия микроколоний даст оценку генетического груза в популяциях, а сопоставление реакции на загрязнение клеток лабораторных линий и выборок из природы — оценку резистентности к мутагенам у особей, только что изъятых из естественных ценозов.

Использование лабораторных линий при мутагенотипировании на популяционном уровне требует более тщательного отбора этих линий, выявления среди них тех форм, которые будут четко и контрастно реагировать на эталонные мутагены.

Высокой чувствительностью обладают аргининзависимые (АРГ-) штаммы *Chlorella vulgaris*, у которых можно одновременно учитывать редкие ревертанты к прототрофности ( $1 \times 10^{-8}$  и чаще), пигментные мутанты, устойчивые к ядам мутанты и наследуемую мозаичность по морфологии колонии [16].

Чувствительность к летальному действию мутагенов у водорослей снижена, что позволяет испытать по мутагенности более широкий диапазон доз. Кроме того удается сдвинуть эти рамки путем отбора специальных типов мутантов. Чувствительность к УФ-лучам у хлореллы связана, видимо, с нарушением репарации [19].

При изучении природной изменчивости хлореллы обнаружен феномен генетической адаптации популяций зеленых водорослей к новому для них фактору — хроническому воздействию ионизирующей радиации в почве, загрязненной радиоактивными отходами. Этому посвящена работа В. А. Шевченко [32]. Автор наблюдал сезонную цикличность частот встречаемости пигментных мутантов: задержка клеточного цикла зимой увеличивала индивидуальную дозу, что реализовалось во вспышке мутабельности весной; элиминация этих мутантов при размножении популяции, снижение дозы на поколение и отбор более устойчивых клонов уменьшали долю пигментных мутантов в летний и осенний период. За 5 лет в популяции существенно увеличилась доля клонов, резистентных к летальному эффекту радиации. Но на этот момент существовал оптимум радиационного фона (0,63—6,3 рад/сутки), превышение которого достоверно снижало эффективность отбора по радиорезистентности. Через 11 лет адаптация популяции произошла и на избыточном фоне радиации — уровень резистентности возрастал линейно с дозой во всем диапазоне концентраций загрязнения изотопами. У радиорезистентных форм увеличилось содержание тиолов [32]; по данным И. Е. Камчатовой [11] у одного из этих штаммов (Ш-63) уве-

лично содержание цистеина. Как показали дальнейшие исследования [12], увеличение содержания цистеина в штамме Ш-63 не ведет к снижению мутабельности по критерию «частота пигментных мутантов», тогда как аналогичное обогащение биомассы цистеином у штаммов-фидеров резко снизило мутабельность по данному признаку, не затронув при этом радиочувствительности по критерию «выживаемость».

Таким образом, уже среди изученного разнообразия штаммов хлореллы имеются формы, перспективные для использования в системе мутагенотипирования на всех этапах этого исследования: ауксотрофы, штаммы с измененной репарацией, резистентные к мутагенам формы. На наш взгляд, лучше все разнообразие типированных штаммов одного вида создавать в клоновом потомстве одного штамма дикого типа. Это обеспечит единство генетического фона типированных штаммов и позволит сопоставлять эффекты для всей совокупности штаммов клонового происхождения с реакцией совокупности штаммов хламидомонады.

**2. Гаплобионты с зиготической редукцией (хламидомонада 137С).** Хламидомонада обладает всеми преимуществами, которые были отмечены для хлореллы, сверх того — это клетки, обладающие поведением, а половой процесс дает возможность скрещивать мутанты, изучать локализацию изменения в одном из трех типов генофоров клетки (рис. 1 и 2).

Так, например, показано, что интеркалирующие красители акрифлавин и этидиум бромид вызывают чаще всего появление карликовых мутантов с дыхательной недостаточностью. Эти мутации наследуются по менделеевской схеме и напоминают мутацию дыхательной недостаточности *petite*, индуцируемую в ДНК митохондрий у гетеротрофных организмов. Предполагается, что и у хламидомонады поражается преимущественно митохондриальная ДНК [39].

Стрептомицин является специфическим мутагеном по отношению к внехромосомным детерминантам [50] у хламидомонады и у хлореллы [27]. Супермутаген *N*-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозо-гуанидин (НГ) индуцирует широкий спектр как внехромосомных, так и ядерных мутаций. Под действием этого агента получены как ядерные (СТРУ-100), так и оргanelльные мутации в локусах, контролирующих устойчивость к антибиотикам (СТРУ-500) и даже зависимость от них. Антибиотикозависимые мутанты (АЗ) — чрезвычайно чувствительная система, в которой действие экзогенного мутагена будет сочетаться с эффектом антибиотика, ставшего необходимым для клетки метаболитом. В такой ситуации было зарегистрировано появление новых оргanelльных мутаций [53].

Для тестирования мутаций в ядерных генофорах широко применяются штаммы с аргининзависимостью (локусы I группы сцепления *arg1*, *arg7* и локус *arg4* в XII группе сцепления), перспективны локусы лотребности в никотинамиде, локусы светочувствительности и ацетатзависимости. Наиболее удобную модель представляет собой локус *arg7*, контролирующий аргининсукцилат-лиазу. Аллели этого локуса комплементарную между собой, построена рекомбинационная карта сайтов мутации, индуцированных УФ-лучами, НГ и этилметансульфонатом (ЭМС). По мутабельности штаммы с соответствующими аллелями расположились в следующий ряд:  $\underset{\text{ЭМС}}{\text{arg7-1}} > \underset{\text{ЭМС}}{\text{arg7-4}} > \underset{\text{ЭМС}}{\text{arg7-2}} > \underset{\text{НГ}}{\text{arg7-5}} > \underset{\text{УФ}}{\text{arg7-8}} > \underset{\text{ЭМС}}{\text{arg7-3}} = 0$  (под шифром указан агент, вызвавший данную мутацию). Первые два штамма были способны к спонтанному ревертированию к прототрофности, иерархия частот индуцированной ЭМС и НГ прототрофности отражена в данном ряду. У штамма с ал-

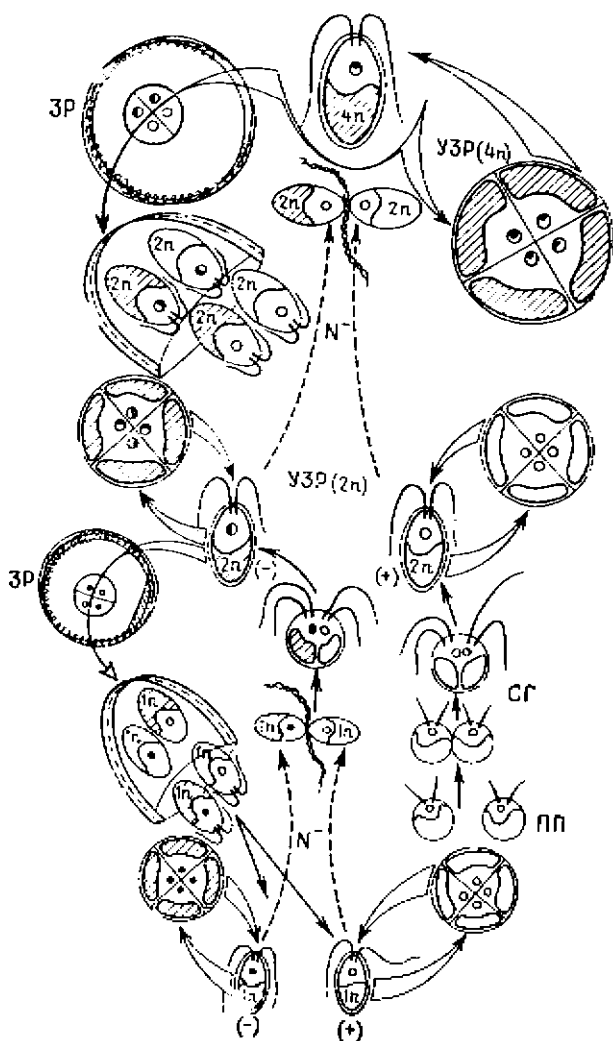


Рис. 2. Жизненный цикл хламидомонады линий 137С.

Изменения плоидности от гаплоидии 1*n* к диплоидии 2*n* после копуляции (+) и (-) гамет и тетраплоидии 4*n* при утрате зиготической редукции у диплоидов УЗР(2*n*) и тетраплоидов УЗР(4*n*), нормализация плоидности в результате зиготической редукции (ЗР). Вегетативное размножение символизировано незаштрихованными стрелками, гаметогенез при изъятии азота (N<sup>-</sup>) — прерывистые стрелки, получение диплоидов (+) типов спаривания возможно лишь при получении протопластов (ПП) и последующей соматической гибридизации (СГ). Заштрихованные хлоропласты и ядро обозначают передачу признаков, детерминированных ядром.

делью *arg7-3* не было найдено ни одного ревертанта среди 10<sup>8</sup> потомков. Сопоставляя с данными по рекомбинации и комплементации аллелей указанные выше сведения о размерах мишени реверсии, авторы сделали следующие выводы: сайты 7-2, 7-4, 7-5, 7-8 они отнесли к точковым мутациям в различных участках гена, сайт 7-1 — в районе начала считывания [44].

Для тестирования мутагенной активности в гетеротрофных условиях можно использовать штаммы со светочувствительностью (СВЧ), при этом следует разделять момент воздействия агента и момент селекции ревертантов — устойчивых к свету клонов. При проведении экспериментов в условиях освещения следует иметь в виду фотохимические эффекты, опосредованные хлорофиллом и протопорфирином у мутантов [36, 37]. Фототоксичность и фотомутагенность ряда загрязнений показана на хламидомонаде [51, 52] по реверсиям к прототрофности *arg1* штаммов и по внеядерным реверсиям от потребности в антибиотиках стрептомицине и неамине. Привлекательность этой модели для учета мутабельности заключается в том, что светочувствительность типа ПБЛК I и II блоков описана как для хламидомонады, так и для хлореллы [14]. Частоты реверсий сопоставимы у мутантов этих двух водорослей [45]. Аналогичные мутанты получены нами у *Saccharomyces* [15, 25].

Современное состояние генетики хламидомонады позволяет не только использовать для мутагенотипирования гаплоидные формы хламидомонады, но и создавать полиплоидные клоны с генетически контролируемым уровнем умножения генома: диплоиды, триплоиды и анеуплоиды [34, 33, 35].

**3. Утрата зиготической редукции у хламидомонады линий 137С.** Метод получения диплоидов предложен Эберсольдом [41] и заключается в отборе быстрорастущих прототрофов среди потомства с аргининзависимостью, детерминированной двумя комплементирующими тесно сцепленными мутациями (*arg1* и *arg7* локусы или разные аллели локуса *arg7*). Часть зигот в таком скрещивании не переходит в стадию покоя и последующего мейоза, а продолжает бесполое размножение, но уже в диплоидном состоянии. Получив диплоиды с маркерами светочувствительности, мы можем отобрать триплоиды по той же методике — отбором на селективном фоне (среда без аргинина и освещения). Скрещивание триплоидов с гаплоидом или двух диплоидов дает тетраплоидные зиготы (рис. 2), которые при зиготической редукции дают диплоидное потомство, а при утрате зиготической редукции появляется тетраплоидный клон.

Диплоиды имеют ряд новых черт: у них резко возрастает эффективность клонирования и общая устойчивость к мутагенам; для гетерозиготных диплоидов становится возможным учет митотической рекомбинации (внутригеновой и межгеновой). По комплементации рецессивных мутаций мы можем установить их аллельность, выявить доминантные аллели, на аутотрофных по ауксотрофности и светочувствительности диплоидах возможно более точно описать природу реверсий к дикому типу (сравнить мутации). Таким образом, использование явления утраты зиготической редукции дает нам формы с регулируемой пloidностью, а в качестве триплоидов — линии 137С хламидомонады, с классическими гаплоидными формами *Saccharomyces cerevisiae*, при этом не утрачиваются все преимущества хламидомонады как подвижных фотосинтезирующих организмов из группы первичных продуцентов.



## 2. ЭТАПЫ СОЗДАНИЯ СИСТЕМЫ ШТАММОВ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИХ В МУТАГЕНОТИПИРОВАНИИ ЗАГРЯЗНЕНИИ

Конечной целью данной системы мутагенотипирования является надежный прогноз состояния генетического здоровья популяций первичных продуцентов гидросферы и оценка степени опасности эскалации генетического нездоровья в звенья гетеротрофов, потребляющих биомассу водорослей саму по себе или в переработанном гетеротрофами виде. Возникает противоречие, ибо требование генетической изученности системы заставляет нас остановиться на малой выборке типированных штаммов, а требование надежности прогноза предполагает пополнение выбранных штаммов представителями природных популяций.

Система ступенчатого тестирования, предложенная В. В. Павленко [21], предполагает работу в три этапа: предварительные исследования на удобных моделях, дающие сведения о дозовых зависимостях эффектов загрязнений; оценка механизмов обнаруженных эффектов реальных доз загрязнений; изучение специфичности проявлений генетической опасности для набора объектов с различной экологией и с различной структурой генотипа. Предполагается переходить от оценки опасности для отдельных видов к оценке экосистем в целом.

Предлагаемая нами система удовлетворяет требованиям первых двух этапов и лишь частично требованиям третьего этапа — этапа оценки опасности для экосистемы. Пополнение на этом этапе системы штаммов клонами природных форм — типичных представителей первичных продуцентов изучаемого водоема, как предложено К. В. Квитко и В. И. Хроповой [16], может помочь в решении части проблем, а именно проблем оценки генетической опасности для популяций первичных продуцентов. Что же касается передачи и эскалации генетического нездоровья в звенья гетеротрофов вследствие присущей водорослям (и их потребителям) способности к кумуляции в биомассе загрязнений, то это потребует смыкания данной системы штаммов зеленых водорослей с генетическими тест-системами из гетеротрофов. В этом случае параллельно учету генетического груза в популяциях водорослей следует оценить влияние их метаболизма на загрязнение вод путем добавок культуральной жидкости, автолизатов биомассы и отмытых от загрязненных вод живых клеток водорослей к модельным популяциям трех типов гетеротрофов: потребителей выделений и автолизатов водорослей (бактерий и грибов), сапрофитов — потребителей биомассы и хищников, питающихся живыми клетками. Наиболее вероятными кандидатами среди одноклеточных гетеротрофов будут штаммы Эймса (сальмонелла) и генетические линии дрожжей, уже использованные для оценки вреда ряда загрязнений [21, 3, 10, 17, 22]. Среди хищников, потребителей живой массы клеток водорослей, перспективны три объекта: инфузория тетрахимена, часто используемая для лабораторной оценки пищевой ценности; *Daphnia magna* — фильтратор, традиционный объект водной токсикологии, для которого найден способ выявления наследуемых изменений [7], и дрозофила, успешное использование которой в системе «дрожжи—дрозофила» [18] позволяет надеяться на успех в создании системы «водоросли—дрозофила».

Таким образом, система штаммов зеленых водорослей может приобрести значение связующего звена в более комплексной системе мутагенотипирования загрязнений гидросферы. Как уже отмечалось, именно это звено (первичные продуценты) отсутствует в ранее предложенных системах генетического мониторинга [8, 21, 22].

Наборы штаммов водорослей в системах мутагенотипирования мы предлагаем формировать из трех групп организмов:

1. Штаммы хлореллы клонового происхождения (например, потомство штамма В), типированные по реакции на эталонные мутагены в отдельных локусах ядра (АРГ, СВЧ, СТРУ—100) и хлоропласта (СТРУ—500, АЗ). Дополнением к ним послужат штаммы хлореллы или *сценедесмуса* местного происхождения, которые устранят узость штаммовой специфичности реакции на мутагены.

2. Типированные штаммы хламидомонады линий 137С, в том числе гаплоиды и диплоиды дикого типа, обладающие двигательной активностью; диплоиды с маркерами, удобными для учета реверсий, митотической рекомбинации, прямых мутаций в оргanelльных генах антибиотикоустойчивости; типированные гаплоиды и диплоиды АРГ и СВЧ фенотипа с мутацией антибиотикозависимости в оргanelльном генофоре (АЗ).

3. Эндемики или доминирующие виды других типов водорослей — группа, которая будет пополняться по мере развития частных генетик этих форм. В настоящее время генетически изученные штаммы известны лишь для эвгленовых, начато изучение рекомбинации у динофлагеллят, у харовых и бурых водорослей. Но все эти примеры не позволяют рекомендовать какие-либо водоросли, кроме зеленых, для целей мутагенотипирования. Нужна большая предварительная работа для привлечения новых объектов в сферу генетических исследований.

Выбрав типированные штаммы, необходимо отработать с ними четыре группы методик проведения тестов на токсичность и мутагенез:

1. Экспресс-методики выявления биологически активных загрязнений и их сочетаний по изменению токсикантом флуоресценции хлорофилл-белковых комплексов пластыди дикого типа [20] и по изменению подвижности клеток, подобно тому как определяют температурные границы активности клеток хламидомонады [1] или титруют загрязнения с помощью клеток дуналиеллы [23].

2. Методики выявления градиентов токсичности и градиентов мутагенеза на плотных средах с газомом клеток тест-объекта [16].

3. Оценка спонтанного и индуцированного генетического груза в популяциях и клонах водорослей путем выращивания суспензий водорослей в средах с добавками загрязнений и учета повреждений клеток по критериям, предложенным в работах В. А. Шевченко [31, 32], Э. Н. Ваулиной с соавторами [4, 5]: а) эффективность спорообразования — по разнообразию живых и погибших микроколоний, б) эффективность клонирования, устанавливаемая по числу макроколоний, в) урожай биомассы и прирост клеток.

4. Оценка опосредованного водорослями эффекта загрязнений, в том числе: а) очистка культуральной среды от загрязнителя по пригодности ее для функционирования тех же водорослей или размножения гетеротрофов, б) накопление токсиканта в биомассе, устанавливаемое на тех же водорослях или на гетеротрофных организмах типа сальмонеллы и дрожжей, в) передача токсичности в автोलизатах, или в биомассе, или в живых клетках при поедании их животными тест-объектами (тетрахимена, дафнии и дрозофила).

Исходя из свойственной первичным продуцентам способности к избирательному накоплению загрязнений гидросферы, мы выделяем водоросли среди других микроорганизмов как основное, связующее, звено в типировании мутагенности загрязнений на молекулярном, клеточном, популяционном и ценоотическом уровнях. Таким образом, мутагенотипирование загрязнений без использования водорослей (первичных продуцентов) может привести к ошибочным выводам и тем самым ослабить

эффективность природоохранных мер. Предлагается пополнить систему генетическими линиями хлореллы и хламидомонады, и клонами из природных популяций, выбранными по специфическим реакциям ядерных и хлоропластных генов на действие эталонных мутагенов. Это позволит выявлять специфические повреждения детерминантов фотосинтетической функции в эукариотической клетке, повреждения цитоскелета и функции стигмы. Подвижность хламидомонады открывает возможность токсикологического изучения изменений функций движения и поведения, что более всего соответствует требованиям автоматических систем слежения за качеством вод. Высокая концентрация хлорофилла в клетках водорослей облегчает регистрацию флуоресценции этих порфиринов — общепринятый тест на нарушения транспорта электронов в фотосистемах хлоропласта. Биомассу водорослей из экспериментов по мутагенотипированию предлагается использовать для типирования на мутагенность для гетеротрофов. Тем самым, водоросли могут стать связующим звеном в генетико-токсикологических экспериментах по мутагенотипированию загрязнений и мониторингу популяции.

### Summary

The absence of primary producers (phototrophs) among test-objects used for mutagens screening and genetical monitoring was described as erroneous and deleterious for future of biosphere. The proposition was to use same *Chlorella* and *Chlamydomonas* strains (genetically known ones), which should be typed by studying their reaction onto standart mutagens, in experiments with unknown polutants, as a part of the system of mutagenotyping in molecular, cellular, population and biocoenotic levels. In course of screening we study two first levels, the study of genetic damage in samples from natural population gives us the briefing of the population level. The use of filtrates, autolysats and biomass of algae grown on poluted substrates (for studying the accumulation, transformation and activation of mutagens by primary producers is the first step in escalation of genetical damage in to food changes) lets the possibillity to study the polutants effect on ecosystem basis.

### УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров В. Я. Клетки, макромолекулы и температура. Л., 1975. 329 с.
2. Будыго М. И. Глобальная экология. М., 1977. 327 с.
3. Буевич Г. В., Павленко В. В. Изучение мутагенного и токсичного действия промстоков сульфат-целлюлозного производства и их органических компонентов с использованием модели Эймса учета генных мутаций на индикаторных штаммах *Salmonella typhimurium*. — В кн.: Проблемы экологии Прибайкалья. Иркутск, 1979, вып. 2, с. 5—6.
4. Ваулина Э. Н., Анисеева И. Д., Коган И. Г. Действие факторов внешней среды на одноклеточную водоросль — хлореллу. — В кн.: Генетические последствия загрязнения среды. М., 1977, с. 80—88.
5. Ваулина Э. Н., Анисеева И. Д., Коган И. Г. Индуцированный мутагенез и селекция хлореллы. М., 1978. 75 с.
6. Гилева Э. А. О накоплении некоторых химических элементов пресноводными водорослями. — Тр. Ин-та биологии УФ АН СССР, 1965, вып. 45, с. 5—31.
7. Денисова Т. П. Анализ биологического действия N-нитрозометил-мочевины на *Daphnia magna*. — В кн.: Проблемы экологии Прибайкалья. Иркутск, 1979, вып. 2, с. 8—10.
8. Дубинин Н. П., Пашин Ю. В. Мутагенез и окружающая среда. М., 1978. 130 с.
9. Захаров И. А., Тугаринов В. В. Радиочувствительность одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris*. — Радиобиология, 1964, т. 4, № 1, с. 92—95.
10. Зимина Т. А. Возникновение цитоплазматических и ядерных мутантов с дыхательной недостаточностью под действием антропогенных факторов. — В кн.: Проблемы экологии Прибайкалья. Иркутск, 1979, вып. 2, с. 11—13.
11. Камчатова Н. Е. Мутационный анализ признака «накопление цистина клетками хлореллы». Автореф. канд. дис. Л., 1975. 17 с.
12. Камчатова И. Е., Квитко К. В., Борщевская Т. Н. Модификация мутабельности у штаммов хлореллы, обогащенных цистеном. — Тезисы докл.

- IV Всесоюзного симпозиума «Молекулярные механизмы генетических процессов». М., 1979, с. 95—96.
13. Квитко К. В. Биология и генетика штамма 137С *Chlamydomonas reinhardtii*. — В кн.: Экспериментальная альгология. Л., 1977, с. 75—105.
  14. Квитко К. В. 1979. Сравнительная генетика зеленых водорослей родов *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*. Автореф. докт. дис. Л., 1979, 47 с.
  15. Квитко К. В., Чунаев А. С., Борщевская Т. Н. и др. Генотипическая и фенотипическая изменчивость пигмент-дипропендиого комплекса мутантов зеленых водорослей. Сообщ. 1. — В кн.: Изучение физиологии культивирования водорослей с высоким коэффициентом использования света. Л., 1976, с. 49—73.
  16. Квитко К. В., Хролова В. И. Использование ауксотрофных мутантов хлореллы для выявления мутагенной активности алкильных производных мочевины. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1979, № 8, с. 82—88.
  17. Константинова Л. М. Оценка мутагенности протстоков сульфат-целлюлозного производства с использованием дрожжей с нормальной и нарушенной системой репарации. — В кн.: Проблемы экологии Прибайкалья. Иркутск, 1979, вып. 2, с. 17—18.
  18. Лучникова Е. М., Ибрагимов А. И., Инге-Вечтомов С. Г. Использование эколого-генетической модели дрожжи — дрожфила для изучения роли стерильного метаболизма вида-производителя в регуляции численности вида-потребителя. — В кн.: Проблемы экологии Прибайкалья. Иркутск, 1979, вып. 2, с. 46—47.
  19. Озол А. А. Изучение роли пострадиационного восстановления в радиочувствительности и мутационном процессе у водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*). Автореф. канд. дис. Л., 1973, 22 с.
  20. Ошаров А. Б., Назарова Г. Д., Подсосный В. А., Мыльникова Э. В. Влияние диметилсульфида на фотосинтез и дыхание *Draparnaldiella pilosa* (С. Meyer et Scabitschevskij). — В кн.: Проблемы экологии Прибайкалья. Иркутск, 1979, вып. 2, с. 19—20.
  21. Павленко В. В. Токсикогенетические исследования антропогенных факторов, загрязняющих водосмы. — В кн.: Проблемы экологии Прибайкалья. Иркутск, 1979, вып. 2, с. 21—22.
  22. Павлов Ю. П., Тумасян Э. А., Ланге Е. К. и др. Реверсии потребности в аденине у дрожжей как тест-система для оценки активности и специфичности мутагенов. — Тезисы докл. IV Всесоюзного симпозиума «Молекулярные механизмы генетических процессов». М., 1979, с. 128.
  23. Стом Д. И., Балаия А. Э., Сретенская М. В. Титрование как способ оценки токсичности в острых опытах. — Гидробиол. журн., 1979, т. 15, № 2, с. 81—82.
  24. Сэджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. М., 1975, 423 с.
  25. Темпер Э. Е., Квитко К. В. Характеристика пигментных мутантов *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz. — Науч. докл. высшей школы, Биол. науки, 1971, № 4, с. 106—111.
  26. Тимофеева-Ресовская Е. А. Распределение радионуклидов по основным компонентам пресноводных водоемов. — Труды Ин-та Биологии УФ АН СССР. Свердловск, 1963, вып. 30, с. 1—78.
  27. Тугаринов В. В., Тхруни Ф. Н., Квитко К. В. О природе стрептомицин-устойчивости у хлореллы. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1971, № 4, с. 142—148.
  28. Хакимов Я. Н. Генетические последствия воздействия гербицида диурона на водоросль *Chlamydomonas reinhardtii*. — Автореф. канд. дис. Л., 1979, 24 с.
  29. Хролова В. И., Квитко К. В., Захаров И. А. Сравнительное изучение мутагенного действия излучений и этиленмина на хлореллу. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1964, № 2, с. 69—76.
  30. Хромов-Борисов Н. Н. Мутагенотипирование у дрожжей — теория и методы. Тезисы докл. III съезда ВОГиС. Л., 1977, с. 491.
  31. Шевченко В. А. Естественный индуцированный мутационный процесс у хлореллы. В кн.: Тезисы соврем. совещ. М., 1967, вып. 1, с. 246—278.
  32. Шевченко В. А. Радиационная генетика одноклеточных водорослей. М., 1979, 256 с.
  33. Чернышова В. П. Изучение модифицирующих пигментацию мутаций у штамма *Chlamydomonas reinhardtii* разной плоидности. Сообщ. 2. — Генетика, 1978, № 1, с. 154—158.
  34. Чернышова В. П., Квитко К. В. Изучение модифицирующих пигментацию мутаций у штаммов *Chlamydomonas reinhardtii* разной плоидности. Сообщ. 1. — Биология, 1976, т. 12, № 9, с. 44—49.
  35. Чернышова В. П., Бодунова Е. Н., Квитко К. В. Изменение адаптационных признаков клетки водорослей при переходе от гаплоидии к диплоидному состоянию. — В кн.: Проблемы экологии Прибайкалья. Иркутск, 1979, вып. 2, с. 34—35.

36. Чунаев А. С. Генетическая реконструкция системы светозащиты у зеленых водорослей. — Автореф. канд. дис. Л., 1976. 22 с.
37. Чунаев А. С., Александрова Н. Н., Яковлев М. Д. и др. Чувствительность к видимому свету мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, различающихся по содержанию пигментов. — В кн.: Фотобиология животной клетки. Л., 1979, с. 236—241.
38. Adams M., Warr J. R. The mutagenic activity of hydroxyurea in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Mut. Res., 1976, vol. 41, p. 217—224.
39. Alexander N. J., Gillham N. W., Boynton J. E. The mitochondrial genome of *Chlamydomonas*: Induction of minute colony by acriflavine and their inheritance. — Mol. Gen. Genet., 1974, v. 130, p. 275—290.
40. Cain J. R., Trainor F. R. Regulation of gametogenesis in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). — J. Phycology, 1976, v. 12, N 4, p. 383—390.
41. Ebersold W. T. Heterozygous diploid strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. — Genetics, 1963, v. 48, p. 888.
42. Gowans C. S. Genetics of *Chlamydomonas moewsi* and *Chlamydomonas eugametos*. — In: The Genetics of Algae. Bot. monographs, 1976, v. 12, p. 145—173.
43. Hudock G. A., Rosen H. Formal genetics of *Chlamydomonas reinhardtii*. — In: The Genetics of Algae. Bot. monographs, 1976, v. 12, p. 29—48.
44. Konvalinkova V., Matagne R. F., Loppes R. Induction and analysis of revertants from various arg7 mutants lacking argininosuccinate lyase in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Mut. Res., 1974, v. 24, p. 69—72.
45. Kvitko K. V., Tugarinov V. V., Ho P. T. e. a. Mutational analysis, a method of studying genetic structure of green algae. — In: Genetic aspects of Photosynthesis. Junk Co. The Hague, 1975, p. 225—236.
46. Laube V., Ramaoorthy S., Kushner D. J. Mobilization and accumulation of sediment bound heavy metals by algae. — Bull. Environm. Contam. Toxicol., 1979, v. 29, p. 763—770.
47. Lewin R. A. (Ed.). The Genetics of Algae. Botanical monogr., 1976, v. 12. Oxford, L. 360 p.
48. Necas J. Physiological responses and permanent changes in some characteristics of two chlorococcal algae treated by a mutagen when grown under various culture conditions. — Arch. Hydrobiol. (suppl. 41), 1972, Algological studies, N 7, p. 214—234.
49. Necas J. Sensitisation of three strains of chlorococcal algae for UV-effects by bromodeoxyuridine. — Biologia plantarum, 1976, v. 18, p. 1—12.
50. Sager R. Genetic analysis of Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. — Advances in Genetics, 1977, v. 19, p. 287—340.
51. Schimmer O. Untersuchungen zur mutagenen Wirksamkeit von Cumarinderivaten in *Chlamydomonas*. II. — Mut. Res., 1977, v. 44, p. 33—42.
52. Schimmer O. Untersuchungen zur mutagenen Wirksamkeit von Cumarinderivaten in *Chlamydomonas*. IV. — Mut. Res., 1978, v. 52, p. 353—360.
53. Schimmer O., Arnold C. G. Untersuchungen über Reversions- und Segregationsverhalten eines außerkaryotischen Gens von *Chlamydomonas reinhardtii* zur Bestimmung des Erbtagers. — Mol. Gen. Genet., 1970, v. 107, p. 281—290.
54. Schimmer O., Werner R. Mutagenic effect of aflatoxin B1 on nuclear and extranuclear DNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Mut. Res., 1974, v. 26, p. 423—425.
55. Tan C. K., Hastings P. J. DNA synthesis during meiosis of eightspored strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. — Mol. Gen. Genet., 1977, v. 152, p. 311—320.

## ВЛИЯНИЕ КОФЕИНА НА ЧАСТОТУ ИНДУЦИРОВАННЫХ РЕНТГЕНОМ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У ЛИНИЙ КУР, СЕЛЕКТИРУЕМЫХ ПО РЕАКТИВНОСТИ

Л. А. АЛЕКСЕЕВИЧ, О. А. МАЦКЕВИЧ, Л. П. ШЕВЧЕНКО

Кофеин довольно широко используется в последние годы как модификатор мутационного процесса для изучения физиологии становления мутаций [1, 5—7, 11, 16]. Предполагается, что кофеин вызывает ингибирование ферментных систем, участвующих в процессах репарации, способствуя переходу потенциальных повреждений в мутации. Однако механизм действия кофеина остается не до конца ясным. Это касается,