



Агроекологія, радіологія, меліорація

УДК 631.4/95; 575.22; 574.2
© 2012

І.А. Козерецька,
кандидат
біологічних наук

С.В. Демидов,
доктор
біологічних наук

Т.В. Мариненко

Київський
національний університет
імені Тараса Шевченка

С.Г. Корсун,
кандидат сільсько-
господарських наук
Національний науковий
центр «Інститут
землеробства НААН»

СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РЕКОМБІНОГЕННОСТІ ҐРУНТУ, ПРИРОДНИХ ВОД І РОСЛИННИЦЬКОЇ ПРОДУКЦІЇ В АГРОЛАНДШАФТАХ

*Запропоновано спосіб визначення рекомбіногенності ґрунту, природних вод і рослинницької продукції в агроландшафтах, який полягає у введенні в живильне середовище *Drosophila melanogaster* досліджуваних зразків ґрунту, води, рослинницької продукції та вирощуванні на ньому гетерозиготних за досліджуваними мутаціями самок. У їхньому потомстві розраховують частоту кросоверних особин, за якою, у свою чергу, встановлюють факт збільшення/зменшення (або ні) частоти рекомбінації порівняно з контролем.*

Наслідком сучасного антропогенного пресингу є перерозподіл елементів і речовин у біосфері, що призводить до скупчення їхніх токсичних похідних у ґрунтах, природних водах, рослинницькій продукції. Трофічним ланцюгом такі речовини можуть потрапляти до організму людини і створювати загрозу її здоров'ю.

Нагромадження критичних кількостей ксенобіотиків, полутантів і навіть надприродних кількостей біогенних елементів, що можуть впливати на рівень деградування чи забрудненості компонентів агроекосистеми, визначають під час проведення фізико-хімічних та біологічних досліджень. Проте часто вплив цих чинників не обмежується організмами, які безпосередньо зазнають їхньої дії, тому постає потреба з'ясувати, як позначається вплив конкретного чинника або групи чинників на якісному складі генотипів наступних поколінь. З огляду на це визначення генетичного статусу процесів, які відбуваються в ґрунті, природних водах і рослинницькій продукції за сучасного техногенного навантаження у біосфері, є актуальним.

Загальними властивостями всього живого є процеси рекомбінації, зокрема гомологічної ре-

комбінації (кросинговеру). Порушення цих процесів призводить до зміни комбінацій алелів різних генів у наступному поколінні на рівні окремого організму, що, у свою чергу, призводить до відповідних змін у популяції загалом. Тому визначення саме рекомбіногенної активності різних компонентів агроекосистеми є важливим.

Відповідно до класичних досліджень Т. Моргана відстань між генами в хромосомах у стандартних умовах є сталою величиною [8]. Однак, незважаючи на те, що відстань для двох фіксованих точок на генетичній карті є постійною, частота кросинговеру може залежати від багатьох факторів як внутрішньої (вік особини, місце гена на хромосомі, генетичне оточення, рівень метилування ДНК), так і зовнішньої (температура, вологість, щільність популяцій, забруднення довкілля, зокрема радіоактивне) природи [3].

Зазвичай для визначення сумарного генотоксичного ефекту окремих компонентів агроекосистем використовують біологічну індикацію та біологічне тестування [2]. Застосування в біоіндикації тесту на рекомбіногенну активність пропонуємо вперше.

О.О. Жученко та А.Б. Король наводять дані про вплив різних чинників (хімічні речовини, температура) на мохові *Sphaerocarpus*, хламідомонадні, на кукурудзу, гіацинтови, томати [3]. Однак усі ці експерименти є науковими дослідженнями без розробки відповідних методик.

Водночас у наукових публікаціях наведено методики з використання тесту на рекомбіногенну активність у модельних організмів за різних факторів впливу [6, 9–12]. Найчастіше як модельні організми використовують дріжджі-сахароміцети. Головним недоліком методів, пов'язаних з використанням нижчих еукаріот, є складність екстраполяції отриманих результатів на людину, що зумовлено відсутністю процесів метаболічної активації та детоксикації, характерних для ссавців і людини. Рекомбінаційну активність визначають також методом підрахунку соматичної рекомбінації (мозаїцизму) у дрозофіли [5, 7]. Слід зазначити, що цей спосіб дає змогу оцінити процеси рекомбінації в соматичних клітинах на рівні окремої особини, що унеможливорює апроксимацію отриманих результатів на генеративні клітини, а отже, на організм і популяції організмів загалом.

Мета роботи — розроблення способу визначення рекомбіногенної активності компонентів агроєкосистеми через установаження частоти кросинговеру в генеративних клітинах у статевій хромосомі *D. melanogaster* на ділянці між генами *white* (*w*, 1–1,5) і *cut* (*ct*, 1–20).

Матеріали та методи досліджень. Для відпрацювання робочої гіпотези і конкретних елементів методики використано зразки різних типів ґрунту, природних вод, рослинницької продукції, які зазнали агротехногенного та техногенного навантаження різної інтенсивності.

Вважаємо, що низку переваг, порівняно з іншими тест-організмами, має використання методів біотестування із застосуванням класичного генетичного об'єкта *D. melanogaster*. Цей досить добре досліджений об'єкт характеризується вигідними для проведення досліджень показниками: висока плодючість, короткий життєвий цикл, мала кількість хромосом. Крім того, аналіз рекомбіногенної активності на рівні цілого організму дає змогу врахувати той факт, що деякі речовини, які не проявляють рекомбіногенних властивостей, пройшовши додаткову активацію, можуть стати рекомбінаційно активними. Адже ферментативні системи дрозофіли є подібними до мікросомальної фракції печінки ссавців.

Результати досліджень. Визначення рекомбіногенної активності компонентів агроландшафтів пропонуємо здійснювати методом встановлення частоти рекомбінації на ділянці між

генами *w* та *ct*, локалізованими у статевій X-хромосомі, тобто пропонуємо визначати відхилення в частоті рекомбінації, які виникають у генеративній тканині гетерозиготних самок під час контакту з ґрунтом, природними водами, рослинницькою продукцією. Це дасть змогу виявляти негативний вплив трансформації довкілля в агроландшафтах уже на первинних ланках трофічного ланцюга.

Поставлене завдання має реальне розв'язання, оскільки збільшення чи зменшення частоти рекомбінації залежить від будь-яких змін у генетичному апараті клітини — попередниці яйцеклітин, яка має здатність впливати на процес обміну гомологічними ділянками гомологічних хромосом.

Рекомбіногенну активність ґрунту, природних вод, рослинницької продукції, які є компонентами конкретної агроєкосистеми, пропонуємо визначати способом, наведеним нижче.

Для *D. melanogaster* готують живильне середовище, застосовуючи досліджувані чинники. Твердим компонентом є манна крупа та агар-агар, як рідинну основу залежно від різновиду об'єкта дослідження застосовують: відібрані в агроландшафті зразки природних вод (за аналізу природних вод); водну витяжку з відібраних в агроландшафті зразків ґрунту (за аналізу ґрунтів); розчин соку рослин (за аналізу рослинного матеріалу). Контролем є живильне середовище на основі дистильованої води.

За аналізу сухого рослинного матеріалу (зерна, сіна та ін.) готують живильне середовище, в якому рідинною основою є дистильована вода, а твердим компонентом — сухий розмелений рослинний матеріал та агар-агар.

У цьому тесті використовують дві тестерні лінії дрозофіли: лінія 1 — *Canton-S* (C-S), лабораторна лінія; лінія 2 — *w ct* (*w* — *white* — біле забарвлення очей, *ct-cut* — обрізаний край крила; обидві мутації рецесивні).

Незайманих самок лінії 2 (3 особини) разом з двома самцями лінії 1 поміщають у пробірки з живильним середовищем, до складу якого додано зразки досліджуваних компонентів агроландшафту. Потомків I покоління пересаджують на стандартне середовище. Частоту кросинговеру оцінюють, аналізуючи розподілення фенотипових проявів у потомків II покоління. Аналіз проводять під бінокулярним стереоскопічним мікроскопом [4].

Порівнюючи частку кросоверних особин, які розвинулись у контролі та досліджуваному середовищі, виявляють зміну частоти кросинговеру. Під час порівняння застосовують статистичний метод — критерій Фішера [1].

Якщо отримане число більше або дорівнює табличному, то різницю вважають вірогідною, а тестовану речовину — рекомбіногенною.

Висновки

Визначення рекомбіногенного статусу процесів, які відбуваються у ґрунті, природних водах, рослинницькій продукції за сучасного техногенного навантаження у біосфері, є актуальним. Запропонований спосіб полягає у введенні в живильне середовище *D. melanogaster* досліджуваних зразків ґрунту, води, рослин-

ницької продукції та вирощуванні на ньому гетерозиготних за досліджуваними мутаціями самок. У їхньому потомстві розраховують частоту кросоверних особин, за якою, у свою чергу, встановлюють факт збільшення/зменшення (або ні) частоти рекомбінації порівняно з контролем.

Бібліографія

1. Атраментова Л.О., Утєвська О.М. Статистичні методи в біології. — Харків: ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2007. — 208 с.
2. Єрмакова Н.Ю. Застосування експресних біологічних методів в еколого-гідрогеологічних дослідженнях: автореф. дис. на здобуття наук. ступ. канд. геол. наук: спец. 04.00.06. — К., 2000. — 20 с.
3. Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. — М.: Наука, 1985. — 400 с.
4. Загальна і молекулярна генетика. Практикум // Демидов С.В., Безруков В.Ф., Сиволоб А.В. та ін. — К.: Фітосоціоцентр, 2005. — 240 с.
5. Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф. Хромосомы. Структура и функции. — Новосибирск: Изд-во Сибирского отд. РАН, 2009. — С. 153–178.
6. Тоцький В.М., Гандірук Н.Г., Ланцман І.В. Життєздатність і частота кросинговеру на ділянці *b-spl* хромосоми 2 у *Drosophila melanogaster* за вмісту солей важких металів у поживному середовищі // Вісн. ОНУ. — 2003. — Т. 8. — Вип. 1. — С. 75–80.
7. Jacociunas L.V., Dohl R.R., Lehmann M. et al. Recombinagenic activity of water and sediment from Sinos River and Aracá and Garças Streams (Canoas, Brazil), in the *Drosophila* wing spot test // Sci Total Environ. — 2010. — 408, № 3. — P. 571–577.
8. Morgan T.H. Chromosomes and associative inheritance // Science. — 1911. — 34, № 880. — P. 636–638.
9. Muller H.J. The regionally differential effect of X-rays on crossing over in autosomes of *Drosophila* // Genetics. — 1925. — 10, № 5. — P. 470–507.
10. Plough H.H. Radium radiation and crossing over // Amer. Natur. — 1924. — V. 58. — P. 85–87.
11. Whittingill M. Some effects of gamma rays on recombination and crossing-over in *Drosophila melanogaster* // Genetics. — 1951. — V. 36. — P. 332–355.
12. Whittinghill M., Davis D. Increased recombination from female *Drosophila* irradiated as larvae without OOCYTES // Genetics. — 1961. — № 46. — P. 357–360.