



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63490 (13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/18 (2006.01)

G01N 33/24 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РЕКОМБІНОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ КОМПОНЕНТІВ АГРОЛАНДШАФТУ

1

2

(21) u201103156

(22) 17.03.2011

(24) 10.10.2011

(46) 10.10.2011, Бюл.№ 19, 2011 р.

(72) КОЗЕРЕЦЬКА ІРИНА АНАТОЛІЇВНА, КОРСУН
СВІТЛАНА ГЕОРГІЇВНА(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИ-
ТУТ ЗЕМЛЕРОБСТВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ"(57) Спосіб визначення рекомбіногенної активності
компонентів агроландшафту, що включає відбір

наважок досліджуваних зразків рослинницької продукції, води, водних витяжок ґрунту, які додають до живильного середовища, на якому вирощують нащадків першого покоління від схрещування самців лінії дикого типу та самок лінії w st *Drosophila melanogaster*, який відрізняється тим, що оцінюють рекомбіногенну активність компонентів агроєкосистеми за частотою кросинговеру без посередньо у генеративних клітинах модельного об'єкта.

Корисна модель належить до галузі сільського господарства, зокрема до сфери моніторингу еко-токсикологічної ситуації агроландшафтів.

Наслідком сучасного антропогенного пресингу є перерозподіл елементів та речовин у біосфері, що супроводжується накопиченням їх токсичних похідних у ґрунтах, природних водах, рослинницькій продукції. Трофічним ланцюгом такі речовини можуть потрапляти до організму людини, створюючи загрозу її здоров'ю.

Накопичення критичних кількостей ксенобіотиків, полютантів та навіть понадприродних кількостей біогенних елементів, що можуть впливати на рівень деградованості чи забрудненості компонентів агроєкосистеми, визначають при проведенні фізико-хімічних та біологічних досліджень. Проте в низці випадків вплив цих чинників, нажаль, не обмежується організмами, які безпосередньо зазнають їхньої дії, тому постає необхідність встановлення впливу конкретного чинника, або комплексного впливу групи чинників на якісний склад генотипів наступних поколінь.

В контексті вищезазначеного визначення рекомбіногенного статусу процесів, які відбуваються в ґрунті, природних водах, рослинницькій продукції за сучасного техногенного навантаження у біосфері є необхідним. Адже процеси рекомбінації загалом та гомологічної рекомбінації (кросинговеру), зокрема, є загальними властивостями всього живого. Порушення цих процесів призводить до зміни комбінацій алелів різних генів в наступному поколінні на рівні окремого організму, що в свою

чергу призводить до змін у низці поколінь. З огляду на це, визначення саме рекомбіногенної активності різних компонентів агроєкосистеми залишається важливим.

Відповідно до класичних досліджень Т. Моргана, відстань між генами в хромосомах в стандартних умовах є сталою величиною [1]. Але не зважаючи на те, що відстань для двох фіксованих точок на генетичній карті є постійною, частота кросинговеру може залежати від великої кількості факторів як внутрішньої (вік особини, місцезнаходження гену на хромосомі, генетичне оточення, рівень метилування ДНК), так і зовнішньої (температура, вологість, щільність популяцій, забруднення навколишнього середовища, включаючи радіоактивне) природи [2].

Зазвичай для визначення сумарного генотоксичного ефекту окремих компонентів агроєкосистем використовують біологічну індикацію та біологічне тестування [3]. Застосування в біоіндикації тесту на рекомбіногенну активність пропонується авторами вперше.

А.А.Жученко і А.Б.Король наводять дані про вплив різних чинників (хімічні речовини, температура) на мохові *Sphaerocarpos*, хламідомонаду кукурудзу, гіацинтови, томати [4], однак всі ці експерименти являли собою наукові дослідження без розробки відповідних методик та способів.

Разом з тим у наукових публікаціях наводяться способи з використанням тесту на рекомбіногенну активність у модельних організмів за різних факторів впливу [5, 6]. Частіше за все у якості модель-

(19) UA (11) 63490 (13) U

них організмів використовують дріжджі-сахароміцети. Головним недоліком способів пов'язаних з використанням нижчих еукаріот, є складність екстраполяції отриманих результатів для людини, що пов'язано з відсутністю процесів метаболічної активації та детоксикації, характерних для ссавців та людини. Низку переваг, порівняно з іншими тест-організмами має використання способів біотестування із застосуванням класичного генетичного об'єкту *Drosophila melanogaster*. Цей об'єкт характеризується такими вигідними для проведення досліджень показниками, як висока плодючість, короткий життєвий цикл, мала кількість хромосом; об'єкт досить добре досліджений. Крім того, аналіз рекомбіногенної активності на рівні цілого організму дає можливість 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 [7].

Найближчим аналогом є визначення рекомбінаційної активності шляхом підрахунку соматичної рекомбінації (мозаїцизму) у дрозофіли [8].

Для розрахунку частоти соматичного кросинговеру в даному тесті використовують дві тестерні лінії дрозофіли:

лінія 1- multiple wing hairs (mwh; фенотиповий прояв - клітини крила з двома-трьома ворсинками замість однієї);

лінія 2 - flare - (*flr³/ln(3LR)TM3, Ser*; фенотиповий прояв - деформація ворсинок, на кшталт опалення полум'ям). Мутація *flr³* в гомозиготному стані летальна. Тому її підтримують в гетерозиготному стані з балансерною хромосомою TM3 (маркованою мутацією *Ser* - вирізка на крилі).

Згідно цього способу незайманих самок лінії 1 у кількості 10 особин та 5 самців лінії 2 віком 3-5 діб поміщають у пробірку, яка містить стандартне поживне середовище. Через 72±4 години батьків пересаджують у пробірки зі свіжим поживним середовищем, а в колишні пробірки вносять розчини тестованих речовин. Аналіз особин першого поко-

ління починають із 9-10 днів після початку експерименту, потім готують препарати крил. Аналіз препаратів крил проводять в світловому мікроскопі при збільшенні х400. Всі особи, які при цьому утворюються є гетерозиготними за обома мутаціями і тому характеризуються нормальними ворсинками крил. Але завдяки мітотичному кросинговеру на крилах дрозофіл формуються групи ворсинок з мутантною формою. Частота цих подій і є мірою мітотичного кросинговеру [8].

Значним недоліком цього способу є оцінка процесів рекомбінації в соматичних клітинах на рівні окремої особи, що не дозволяє апроксимувати отримані результати на генеративні клітини, а отже на організм та популяції організмів в цілому.

В основу корисної моделі поставлено задачу визначати рекомбіногенну активність компонентів агроєкосистеми шляхом встановлення частоти кросинговеру в генеративних клітинах в статевій хромосомі *D. melanogaster* на ділянці між генами *white* (*w*, 1-1,5) і *cut* (*ct*, 1-20).

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

В даному 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).

Згідно цього способу незайманих самок лінії 2 у кількості 3 особин разом з 2 самцями лінії 1 поміщають у пробірки (2-3 шт.), які містять поживне середовище, до складу якого введені зразки тестованих компонентів агроєкосистеми. Нащадків першого покоління пересаджують на стандартне середовище. Частоту кросинговеру оцінюють, аналізуючи розподілення фенотипових проявів у нащадків у другому поколінні. Аналіз проводять під бінокулярним стереоскопічним мікроскопом у відбитому світлі [9].

Результати дослідження подаються в таблиці

Речовина/ концентрація	Загальне число переліжених особин	Дикий тип	w ct	W	ct	Частота кросинговеру

Статистичну обробку результатів проводять з використанням критерію Фішера, порівнюючи частоту появи кросоверних особин в контрольному та дослідному варіантах [10].

Розрахунки проводять за формулою [10]:

$$F = (\varphi_1 - \varphi_2)^2 \frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2},$$

де φ_1 та φ_2 - кути в радіанах для часток порівнюваних вибірок,

n_1 та n_2 - об'єми вибірок

розраховуються за формулою:

$$\varphi = 2 \frac{\pi}{180} \arcsin \sqrt{p}, \text{ де}$$

p - це частоти появи кросоверів у контролі та досліді.

Розрахований F-критерій порівнюють з критичним значенням при двох значеннях числа ступеню свободи: $df_1=1$ та $df_2=n_1+n_2-2$

Якщо $F_{\text{факт.}} > F_{\text{табл.}}$, то різниця вважається вірогідною, а тестована речовина - рекомбіногенною.

Джерела інформації:

1. Morgan T. H.. Chromosomes and associative inheritance//Science.- 1911, 34.-N 880.-P. 636-638.

2. Colot V. and Rossignol J.L. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device// BioEssays. - 1999.V. 21: P. 402-411.

3. Єрмакова Н.Ю. Застосування експресних біологічних методів в еколого-гідрогеологічних дослідженнях // Автореф. дис. канд. геол. наук: 04.00.06.–К., 2000. –20 с.

4. Жученко А.А. Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции.-М:Наука.-1985.-400с.

5. Whittingill M. Some effects of gamma rays on recombination and crossing-over in *Drosophila melanogaster* // Genetics. - 1951. - Vol.36. - P. 332-355.

6. Тоцький В.М., Гандірук Н.Г., Ланцман І.В. Життєздатність і частота кросинговеру на ділянці b-сп хромосоми 2 у *Drosophila melanogaster*, за вмісту солей тяжких металів у поживному середовищі // Вісник ОНУ. -2003. - Т. 8. - Вип. 1. - С. 75 - 80.

7. Селезнева Е.С., Белоусова З.П., Макарова Т.В. О генотоксичности модифицированных нуклеозидов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2000, т.2., №2, С. 344-347.

8. Vogel E.W. Test for recombinagens in somatic cells of *Drosophila* // Mutat. Res.- 1992.-284.-P.159-175.

9. Загальна і молекулярна генетика Практикум // Демидов СВ., Безруков В.Ф., Сиволоб А.В. та ін. - Київ: Фітосоціоцентр, 2005 - 240 с.

10. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології - Харків: ХНУ імені Карамазіна, 2007, 208 с.