

УДК 575.3:595.773.4

Алшибли Насер Мухамед, асп., Хаустова Н. Д., канд. биол. наук, доц.,
Тоцкий В. Н., д-р биол. наук, профессор, зав. каф.

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, кафедра генетики
и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ПРИСПОСОБЛЕННОСТЬ ЛИНИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, МУТАНТНЫХ ПО ГЕНАМ *b*, *cn* И *vg*

Изучали роль маркерных мутаций в приспособленности *Drosophila melanogaster* линий *b*, *cn*, *vg*, *b cn*, *cn vg*, *b cn vg*. В качестве показателей приспособленности исследовали теплоустойчивость, продолжительность жизни в разных условиях содержания, а также экспрессию гена *Adh*, продукт которого является ключевым в жизнедеятельности мух.

Установили, что линии дрозофилы, содержащие мутацию *vg*, характеризуются укороченными сроками жизни по сравнению с мухами дикого типа и другими исследованными мутантами. Линии *vg* и *b cn vg* отличаются также низкой теплоустойчивостью, которая коррелирует с низкой термостабильностью их АДГ.

Ключевые слова: дрозофила, мутации, приспособленность, АДГ.

Исследование роли морфологических мутаций в проявлениях жизнеспособности мух занимает значительное место в работах по генетике дрозофилы. Описаны мутации, локализованные в разных группах сцепления *Drosophila melanogaster*, влияющие на продолжительность онтогенеза, длительность жизни, выживаемость в экстремальных условиях, плодовитость, половое поведение и т.д. [1-3].

Большинство авторов сходится во мнении, что указанные выше признаки зависят не только от генов, их детерминирующих, но и от других генных локусов и общего генного баланса организма.

Целью данной работы явилось изучение физиологических и биохимических показателей приспособленности мух, мутантных по локусам хромосомы 2.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на изосамочьих линиях *Drosophila melanogaster*, гомозиготных по хромосоме 2, где локализован ген *Adh* и маркерные мутации *b*, *cn*, *vg*. Исследовали одинарных (*b*, *cn*, *vg*), двойных (*b cn*, *cn vg*) и тройных (*b cn vg*) мутантов, а также линию дикого типа Canton-S (C-S).

Мух содержали в стеклянных сосудах (200 мл) на стандартной питательной среде при температуре 25 °С.

Экстремальные условия создавали, подвергая имаго действию экзогенного этанола или повышенной температуры. Этанол добавляли в питательную среду до концентрации 10 % [4].

Для определения теплоустойчивости в пробирки помещали по 10 особей каждого пола и прогревали их в водном термостате 15 мин при 41 °С. По истечении суток вели учет выживших особей. Теплоустойчивость выражали в процентах отношением числа выживших особей к числу прогретых [5].

Продолжительность жизни мух на стандартной среде и при добавлении в корм этанола определяли, помещая в пробирки по 10 особей каждого пола. Подсчет живых мух вели ежедневно, смену корма осуществляли на 5-й день, результаты выражали в днях, на которые приходилась гибель 50 % мух (Lt_{50}) [6].

Экстракты для определения активности АДГ готовили путем гомогенизации навесок исследуемого материала в 0,25 М сахарозе в стеклянном гомогенизаторе при 4 °С. 10 %-е гомогенаты центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин.

Активность АДГ в экстрактах тканей дрозофилы определяли спектрофотометрически на СФ-26, используя инкубационную смесь следующего состава: 0,05 М трис-НСl буфер, рН 8,5; 1,2 мМ НАД⁺; 0,1 М изопропанол. Активность фермента оценивали по увеличению содержания НАДН в среде инкубации в течение 3 мин и выражали в нмолях НАДН/мин·мг белка [7].

Содержание белка определяли по методу Лоури [8].

Термостабильность АДГ определяли по её остаточной активности после прогревания экстрактов мух в водном термостате при 40 °С в течение 5 мин и выражали в процентах отношением активности денатурированного и нативного фермента [9].

Статистическую обработку цифрового материала проводили по Стьюденту [10].

Результаты исследований и их анализ

Используя тест на теплоустойчивость, исследовали выживаемость разных генотипов дрозофилы в условиях гипертермии.

В виду противоречивости литературных данных об уровне теплоустойчивости особей гомо- и гетерогаметного полов, опыты проводили отдельно на самцах и самках шести мутантных линий и мухах дикого типа (табл.1).

Самки линии b оказались более выносливыми в экстремальных условиях по сравнению с самцами, однако степень межлинейных различий практически совпадала в группе самок и самцов. Достоверное снижение теплоустойчивости по сравнению с мухами дикого типа, а также с другими исследованными линиями (кроме линии *sp vg*) отмечали у мутантов *vg* и *b sp vg*.

В литературе имеются сведения об отрицательном влиянии ряда мутаций хромосомы 2 на теплоустойчивость имаго дрозофилы [1, 6], а также на продолжительность жизни особей [2, 3].

Таблица 1

Теплоустойчивость самцов и самок исследуемых линий дрозофилы, %

Линии	♀♀	♂♂	♀♀ × ♂♂
C-S	52,39 ± 1,81	47,57 ± 1,92	50,08 ± 1,32
b	55,33 ± 1,73*	49,00 ± 1,95	52,17 ± 1,29
cn	54,00 ± 2,40	49,16 ± 2,36	51,58 ± 1,68
vg	36,92 ± 2,59**	37,91 ± 3,29**	37,42 ± 2,04**
b cn	57,50 ± 4,51	55,45 ± 4,74	56,48 ± 3,27
cn vg	49,00 ± 4,99	44,00 ± 4,96	46,50 ± 3,45
b cn vg	40,16 ± 2,50**	45,74 ± 2,56	42,95 ± 1,80**

Примечание: n = 125-600; * — различия достоверны по сравнению с самцами той же линии; ** — различия достоверны по сравнению с линией C-S.

Критерием для определения продолжительности жизни взрослых мух служило время, в течение которого выживают 50 % особей при двух вариантах их содержания (стандартная диета и диета с добавлением этанола).

Учитывая возможность половых различий, продолжительность жизни исследовали отдельно у самок и самцов.

При стандартных условиях содержания (табл. 2) большей продолжительностью жизни по сравнению с самцами обладали самки линий b и b cn. Оценивая суммарную продолжительность жизни самок и самцов исследуемых линий, установили, что самыми короткоживущими среди изученных мух являются мутанты vg, cn vg, и b cn vg.

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 3, добавление в корм этанола значительно удлиняет среднюю продолжительность жизни у большинства исследованных мух.

Таблица 2

Продолжительность жизни самцов и самок исследуемых линий дрозофилы в стандартных условиях содержания, дни (Lt_{50})

Линии	♀♀	♂♂	♀♀ × ♂♂
C-S	10,75 ± 0,94	9,64 ± 0,86	10,16 ± 0,64
b	15,71 ± 1,96*	10,83 ± 1,38	13,46 ± 1,32
cn	8,65 ± 0,89	7,76 ± 0,84	8,26 ± 0,33
vg	5,50 ± 0,42**	5,05 ± 0,36**	5,30 ± 0,26**
b cn	11,40 ± 1,32*	8,25 ± 0,63	9,87 ± 0,91
cn vg	5,71 ± 0,45**	5,75 ± 0,80**	5,73 ± 0,30**
b cn vg	5,00 ± 1,53**	5,00 ± 1,63**	5,00 ± 0,97**

Примечание: n = 200-800; * — различия достоверны по сравнению с самцами той же линии; ** — различия достоверны по сравнению с линией C-S.

Продолжительность жизни мух исследуемых линий при разных условиях содержания, дни (Lt_{50})

Линии	Условия содержания	
	стандартная среда	среда с этанолом (10%)
C-S	10,16±0,64	25,46±1,07
b	13,46±1,32	21,50±1,17
cn	8,26±0,33	23,65±1,15
vg	5,30±0,26*	6,10±0,47*
b cn vg	5,00±0,97*	9,56±0,74*

Примечание: n = 200-800; * — различия достоверны по сравнению с линией C-S.

Исключение составляют только мухи линий, мутантных по локусу *vg* (*vg*, *b cn vg*), которые на среде с этанолом, также как и на стандартной питательной среде, погибают значительно раньше других исследованных мух.

Полученные данные о низкой жизнеспособности мутантов *vg* совпадают с данными литературы, которые свидетельствуют о плеiotропном действии указанной мутации. У особей, гомозиготных по этой мутации, отмечали женскую стерильность, задержку развития, низкую конкурентоспособность и др. [11, 12].

Наряду с физиологическими показателями приспособленности исследовали экспрессию гена *Adh*, который играет если не основную, то очень важную роль в адаптации дрозофилы к экзогенному этанолу [4] и другим факторам внешней среды [6].

Исследованные линии мух по уровню активности АДГ можно расположить в следующем порядке: *b cn* > *cn vg* > *b* > C-S > *b cn vg* > *vg* > *cn* (табл. 4).

Особый интерес представляет сопоставление активности и термостабильности АДГ. Остаточная активность, выявленная после частичной термической инактивации фермента, в большинстве случаев не зависела от исходного уровня активности АДГ. Достоверно низкая по сравнению с диким типом и другими линиями мух термостабильность фермента обнаружена только у мутантов *vg* и *b cn vg*, обладающих высокой чувствительностью к экстремальной температуре (табл. 1).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о значительном плеiotропном влиянии мутации *vg* на приспособленность дрозофилы, причем низкая теплоустойчивость мутантов, содержащих маркерный ген, сочетается с низкой термостабильностью их АДГ.

В то же время линии *cn* и *b*, существенно различающиеся уровнем активности АДГ, но обладающие в равной степени терморезистентными аллозимами, оказались достаточно устойчивыми к действию гипертермии и жили более длительный срок во всех вариантах опыта.

Активность и термостабильность АДГ у исследуемых линий дрозофилы

Линии	Активность АДГ, нмоль НАДН/мин·мг белка	Термостабильность, %
C-S	236,11±10,68	63,71±3,72
b	271,52± 7,72*	69,93±4,76
cn	165,76± 8,29*	71,33±5,07
vg	179,66±11,29*	36,83±3,79*
b cn	338,07±10,87*	71,01±4,59
cn vg	282,09±28,63*	70,62±3,70
b cn vg	213,93±15,37	54,03±3,12*

Примечание: n = 10-30; * — различия достоверны по сравнению с соответствующим показателем у линии C-S.

Таким образом, подтверждается ранее высказанное предположение [13], согласно которому приспособленность генотипов к конкретным условиям внешней среды определяется аллельным составом адаптивного комплекса генов (АКГ), формирующегося у особей популяции под влиянием внешних факторов.

Литература

1. Воробьева А. И., Шахбазов В. Г. Зависимость проявления гетерозиса от степени гетерозиготности мутантных линий *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1988. — Т. 24, № 2. — С. 267-273.
2. Боднар Л. С., Бобак Я. П., Белоконь Е. М. Активность алкогольдегидрогеназы у линий *Drosophila melanogaster* с разной продолжительностью жизни // Онтогенез. — 1989. — Т. 20, № 3. — С. 287-293.
3. Тоцкий В. Н., Хаустова Н. Д., Левчук Л. В., Моргун С. В. Генотипические основы низкой жизнеспособности мутантов *vestigial Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1998. — Т. 34, № 9. — С. 1233-1238.
4. Хаустова Н. Д., Тоцкий В. Н. Алкогольдегидрогеназа и адаптация к этанолу у дрозофилы // Генетика. — 1990. — Т. 26, № 8. — С. 1427-1434.
5. Некрасова А. В., Шахбазов В. Г. Особенности рекомбинации у гетерозисных гибридов *Drosophila melanogaster* в условиях высокой температуры // Генетика. — 1990. — Т. 26, № 5. — С. 879-885.
6. Хаустова Н. Д., Тоцкий В. Н., Стрельцова Н. А. Ген-энзимная система алкогольдегидрогеназы и адаптация дрозофилы к повышенной температуре // Генетика. — 1992. — Т. 28, № 5. — С. 73-80.
7. McKechnie S. W., Geer B. W. Regulation of alcoholdehydrogenase in *Drosophila melanogaster* by dietary alcohol and carbohydrate // Insect. Biochem. — 1984. — V. 14, № 2. — P. 231-242.
8. Lowry A. L., Rosebrough N. I., Farr A. L. et al. Proteine measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — V. 193, № 1. — P. 247-250.
9. Chambers G. K., Wilks A. V., Gibson J. B. Variation in the biochemical properties of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase allosymes // Biochem. Genet. — 1984. — V. 22, № 1-2. — P. 153-168.

10. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 150 с.
11. Williams J. A., Bell J. B., Carrol S. B. Control of *Drosophila* wing and haltere development the nuclear *vestigial* gene product // Genes and Develop. 1991. — V. 5, № 12B. — P. 2481-2495.
12. Pessoli C., Laporta D. G., Guerra D., Cavicci S. Fitness components in a *vestigial* mutant strain of *Drosophila melanogaster* // Boll. Zool. — 1986. — V. 53, № 4. — P. 351-354.
13. Тоцький В. Н., Хаустова Н. Д., Андриевский А. М. и др. Экспрессивность ген-энзимных систем и показатели жизнеспособности в онтогенезе инбредных линий и гибридов дрозофилы // Генетика. — 1990. — Т. 26, № 10. — С. 1791-1799.

Алшіблі Насер, Хаустова Н. Д., Тоцький В. М.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

**ПРИСТОСОВАНІСТЬ ЛІНІЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER*,
МУТАНТНИХ ПО ГЕНАХ *B*, *CN*, *VG***

Резюме

Досліджували роль маркерних мутацій у пристосованості *Drosophila melanogaster* ліній *b*, *cn*, *vg*, *b cn*, *cn vg*, *b cn vg*. Показниками пристосованості були терморезистентність та тривалість життя в різних умовах утримання, а також експресія гена *Adh*, який кодує фермент АДГ — ключовий у життєдіяльності дрозофіли.

З'ясували, що мухам, які містять мутацію *vg*, притаманні скорочені строки життя. Мутанти *vg* та *b cn vg* відзначаються, крім того, чутливістю до гіпертермії, що корелює з термочутливістю їхньої АДГ.

Ключові слова: дрозофіла, мутації, пристосованість, АДГ.

Al-Shibly Nasser, Khaustova N. D., Totsky V. N.

Odessa National University after I. I. Mechnikov, Department of Genetics and Molecular Biology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine.

**FITNESS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* LINES MUTANT IN
B, *CN* AND *VG* GENES**

Summary

The role of marker mutations in fitness was studied in the *Drosophila melanogaster* *b*, *cn*, *vg*, *b cn*, *cn vg* and *b cn vg* lines.

Heat resistance, longevity under the different conditions and properties of ADH were examined as fitness parameters.

It was found out that containing a *vg* mutation is remarkable for short life span. Low heat resistance was correlated with low thermostability of ADH in *vg* and *b cn vg* mutants.

Key words: *Drosophila*, mutation, fitness, ADH.