

УДК 575.1:595.773.4

**С. В. Белоконь**, ст. инженерОдесский национальный университет им. И. И. Мечникова,  
кафедра генетики и молекулярной биологии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

## ПРИСПОСОБЛЕННОСТЬ МУТАНТОВ *cn* И *vg* *DROSOPHILA MELANOGASTER* В ДИНАМИКЕ ЗАМЕЩЕНИЯ ИХ ГЕНОТИПОВ

Изучали приспособленность и ген-энзимную систему АДГ у мутантов *cn* и *vg*, различающихся по аллельному контролю фермента. Для выявления роли маркерных мутаций в формировании исследуемых признаков *Drosophila melanogaster* проводили насыщение генотипов мутантов *cn(Adh<sup>S</sup>)* и *vg(Adh<sup>F</sup>)* генами мух дикого типа *C-S(Adh<sup>S</sup>)* и *D(Adh<sup>F</sup>)*. Анализ потомков беккроссов в 5-м, 10-м, 15-м и 20-м поколениях насыщающих скрещиваний показал влияние как маркерных мутаций, так и генотипа в целом на функциональную активность АДГ и приспособленность дрозофилы.

**Ключевые слова:** дрозофила, мутанты, АДГ, приспособленность.

В соответствии с мутационной теорией старения важную роль в определении жизнеспособности организмов играет уровень генетического груза в клетках стареющих особей. В настоящее время у дрозофилы выявлено около 50 генов, мутации которых влияют на продолжительность жизни мух, в основном уменьшая ее. Указанные гены локализованы в 10% генома дрозофилы, из чего следует, что всего таких генов у плодовой мушки может быть около 500 [1]. Отрицательное влияние ряда мутаций обнаружено и в отношении других показателей приспособленности, таких как плодовитость, теплоустойчивость и др. В то же время описаны мутации, которые не только не уменьшают жизнеспособность организма, но и увеличивают ее [2, 3].

Известно, что экспрессия генов, влияющих на приспособленность особей, в значительной степени модифицируется условиями среды и зависит от генного окружения [4, 5, 6]. Для выявления роли мутаций в эффектах жизнеспособности необходимо учитывать генетический фон, на котором проявляется действие мутантных генов, в связи с чем в подобных исследованиях используют линии, выровненные по генотипу.

В соответствии с вышеизложенным целью данной работы было изучение влияния мутаций *cn* и *vg* на компоненты приспособленности мутантов *Drosophila melanogaster* с генотипами, насыщенными генами дикого типа.

## Материалы и методы исследований

Исследования проводили на изогенных [7] линейных мухах дикого типа C-S, D и мутантах *cn*, *vg*, а также на экспериментально полученных формах *Drosophila melanogaster* с замещенными генотипами *cn(C-S)*, *vg(C-S)*, *cn(D)*, *vg(D)*.

*Замещение генотипов путем насыщающих скрещиваний* проводили по следующей схеме: самку дикого типа скрещивали с самцом мутантной линии. В первом поколении скрещивали между собой сибсов, а во втором — отбирали самцов, маркированных по соответствующим генам (*cn* или *vg*), которых вновь скрещивали с самками дикого типа. Возвратные скрещивания проводили в 20-ти поколениях. Таким образом, были получены экспериментальные формы дрозофилы, маркированные по локусам *cn* или *vg*, но с генотипами мух дикого типа (C-S или D).

О степени замещения генотипов судили по частоте аллельных вариантов гена *Adh*, локализованного, как и маркерные гены, в хромосоме 2 дрозофилы. Для определения частоты аллельных вариантов *Adh* в процессе насыщающих скрещиваний индивидуальному электрофоретическому анализу подвергали экстракты тканей соответствующих мутантов (*cn* или *vg*) из 5-го, 10-го, 15-го и 20-го поколений беккроссов.

*Определение электрофоретической подвижности АДГ* проводили в пластинах 7,5%-ного полиакриламидного геля стандартным методом с использованием трис-глицинового буфера pH 8,3 [8].

*Активность АДГ* в экстрактах тканей дрозофилы определяли спектрофотометрически на СФ-26 стандартным методом [9].

*Термостабильность АДГ* оценивали по остаточной активности фермента после прогревания экстрактов тканей мух в водном термостате при 40°C на протяжении 5 мин и выражали в процентах отношении ферментативной активности прогретого и исходного экстрактов [10].

*Плодовитость* мух определяли по числу потомков (имаго) одной пары, содержащейся в пробирке (20 мл) на протяжении 3-х дней [11].

*Продолжительность жизни* мух на стандартной среде 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 пришлась гибель 50% мух ( $L_{t50}$ ) [12].

Для определения теплоустойчивости 3-дневных мух подвергали действию сублетальной температуры ( $L_{t50}$  для дикого типа). В пробирки помещали по 10 особей каждого пола и прогревали их в водном термостате 15 мин при 41°C, по истечению суток вели учет выживших особей. Теплоустойчивость выражали в процентах отношении числа выживших мух к числу прогретых [13, 14].

Математическую обработку полученных результатов производили общепринятыми методами вариационной статистики по Стьюденту [15].

### Результаты исследований и их анализ

Индивидуальный электрофоретический анализ генных продуктов локуса *Adh* показал, что мухи линий C-S и *cn* являются гомозиготами по аллельному гену *Adh<sup>S</sup>*, а мухи линий *D* и *vg* — гомозиготами по аллелю *Adh<sup>F</sup>*. Указанные аллельные варианты *Adh*, как известно, отличаются по структуре и функциональной активности контролируемых аллозимов [5, 6]. Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что в результате проводимых беккроссов аллельное состояние локуса *Adh* постепенно изменяется и у потомков  $F_{B20}$  не отличается от такового у мух дикого типа, служивших материнской формой при возвратных скрещиваниях.

Таблица 1

**Динамика частоты аллельных вариантов *Adh* в процессе насыщения мутантных генотипов генами линий дикого типа**

**n=30–50**

Исследуемые формы	Поклоение беккросса (F <sub>B</sub> )	Частота генотипических классов		
		<i>Adh<sup>F</sup>/Adh<sup>F</sup></i>	<i>Adh<sup>F</sup>/Adh<sup>S</sup></i>	<i>Adh<sup>S</sup>/Adh<sup>S</sup></i>
<i>vg(C-S)</i>	5	0,28 ± 0,08	0,52 ± 0,09	0,20 ± 0,07
	10	0,15 ± 0,06	0,48 ± 0,09	0,37 ± 0,09
	15	0,05 ± 0,04	0,40 ± 0,09	0,55 ± 0,09
	20	0	0	1
<i>cn(D)</i>	5	0,20 ± 0,06	0,50 ± 0,01	0,30 ± 0,08
	10	0,50 ± 0,01	0,30 ± 0,08	0,20 ± 0,06
	15	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0
	20	1	0	0

Так, например, в варианте беккроссов C-S × *vg* частота генотипа *Adh<sup>F</sup>Adh<sup>F</sup>*, характерного для мух линии *vg*, постепенно снижается, и у потомков  $F_{B20}$  достигает нуля. В противоположность этому частота генотипа *Adh<sup>S</sup>Adh<sup>S</sup>* у отбираемых при беккроссах мутантов *vg* увеличивается и после 20-го беккросса составляет 1. Аналогичная закономерность прослеживается в ходе беккроссов D × *cn* с отбором в каждом поколении мутантных самцов *cn*, с той, однако, разницей,

что генотип  $Adh^SAdh^S$ , характерный для мух линии *cn*, вытесняется генотипом  $Adh^FAdh^F$ , свойственным мухам *D*.

Принято считать, что белок АДГ-*F* более активен, но менее стабилен при повышенной  $t^\circ$ , в то время как медленно подвижный АДГ-*S* аллозим характеризуется высокой термостабильностью и меньшей ферментативной активностью [9].

Как следует из данных, представленных в таблице 2, особи линий *D* и *vg*, обладающие АДГ-*F* аллозимом, достоверно превосходят по активности фермента особей линий *C-S* и *cn*, содержащих аллозим АДГ-*S*.

Таблица 2  
Активность и термостабильность АДГ у мутантов дрозофилы в процессе насыщения их генотипов генами линий дикого типа

n=30–50

Исследуемые линии и формы дрозофилы	Поколение беккрасса (F <sub>B</sub> )	Активность АДГ нмольNADH/мин·мг белка	Термостабильность фермента, %
<i>C-S</i>		88,51±4,24	74,94±1,78
<i>D</i>		148,24±9,48	76,65±4,24
<i>cn</i>		92,01±4,44	71,34±2,57
<i>vg</i>		130,05±7,79	20,01±3,09
<i>cn(C-S)</i>	5	98,3±9,23	77,02±4,07
	10	92,91±9,38	74,72±8,68
	15	99,58±5,30	70,32±3,71
	<b>20</b>	<b>94,76±8,58</b>	<b>74,96±1,54</b>
<i>vg(C-S)</i>	5	117,55±12,78	23,38±1,63
	10	110,12±9,34	27,04±2,59*
	15	112,93±6,00	28,00±3,06*
	<b>20</b>	<b>97,28±5,46*</b>	<b>34,65±3,42*</b>
<i>cn(D)</i>	5	94,00±6,20	76,36±4,38
	10	96,01±1,92	78,38±4,87
	15	107,33±3,42*	70,79±5,15
	<b>20</b>	<b>122,49±7,90*</b>	<b>73,22±2,87</b>
<i>vg(D)</i>	5	121,35±11,88	21,61±2,80
	10	121,66±7,58	28,63±2,03*
	15	125,31±7,50	35,76±3,21*
	<b>20</b>	<b>129,29±8,57</b>	<b>45,72±4,30*</b>

\* — Различия достоверны по сравнению с исходной мутантной линией ( $p < 0,05$ ).

Показатели активности и термостабильности АДГ у гибридов указанных насыщающих скрещиваний в первую очередь зависят от смены аллельного контроля этого фермента. Так, у форм *cn(D)* с увеличением количества проведенных беккроссов активность АДГ возрастает на фоне увеличения в популяции частоты генотипа  $Adh^FAdh^F$ , свойственного дикой линии *D*, и уменьшения частоты генотипа  $Adh^SAdh^S$ . Однако прямой зависимости изменений активности фермента от частоты аллелей  $Adh^S$  и  $Adh^F$  не наблюдается.

У десятого поколения потомков *cn(D)* частота аллеля  $Adh^F$  возрастает почти в два раза, а активность фермента практически не изменяется по сравнению с уровнем активности у мух линии *cn*. Достоверное по сравнению с мухами *cn* увеличение активности АДГ у потомков насыщающих скрещиваний наблюдается лишь после 15 беккроссов. Тем не менее, даже после полной замены аллеля  $Adh^S$  на аллель  $Adh^F$  (20 беккроссов) уровня активности, отмеченной у мух линии *D*, не наблюдается. Эти данные свидетельствуют о том, что мутация *cn* в чужом генотипическом окружении способствует модификации свойств аллозимов. Результаты беккросса  $C-S \times vg$  приводят к весьма сходным заключениям. Постепенная замена аллеля  $Adh^F$  на аллель  $Adh^S$  во второй хромосоме потомков не приводит к существенным изменениям активности и термоустойчивости АДГ на протяжении 15 беккроссов. Достоверные сдвиги обнаруживаются только после 20-го насыщающего скрещивания, когда аллель  $Adh^F$  в популяции мух практически полностью замещен аллелем  $Adh^S$ . При этом активность АДГ уменьшается на 25%, а ее термоустойчивость возрастает в 1,7 раза, однако по уровню этих показателей потомки  $F_{B20}$  достоверно отличаются как от исходных мутантов *vg*, так и от мух линии *C-S*. Как следует из представленных данных, несмотря на гомозиготность потомков  $F_{B20}$  по локусу *Adh* ( $Adh^SAdh^S$ ), их алкогольдегидрогеназа по своим свойствам занимает промежуточное положение между *S*- и *F*-аллозимами. Вполне возможно, что мутация *vg*, как и мутация *cn*, имеет определенное отношение к модификациям структуры и свойств фермента. Следовательно, мутантные гены *cn* и *vg* можно рассматривать как гены, модифицирующие экспрессию *Adh*.

Многими авторами показана зависимость жизнеспособности дрозофилы от принадлежности мух к тому или иному *Adh*-генотипу и от уровня активности соответствующего фермента. Причиной этого является чрезвычайно важная роль АДГ в утилизации и детоксикации спиртов — естественных компонентов среды обитания дрозофилы [5, 6]. Сравнительная оценка состояния компонент приспособленности у исследованных линий (табл. 3) подтверждает известный в литературе факт низкой жизнеспособности мутантов *vg*. Как следует из представленных данных, указанные мутанты обладают значительно более низкой плодовитостью и устойчивостью к гипертермии, а также очень коротким сроком жизни по сравнению с мухами дикого типа (*C-S*, *D*) и мутантами *cn*. В то же время мутанты *cn* практически не отличаются от дикого типа дрозофилы по продолжительности жизни и лишь незначительно уступают мухам линии *C-S* по плодовитости, а мухам линии *D* по теплоустойчивости. Этот факт находит подтверждение в данных литературы, свидетельствующих о высокой приспособленности многих мутантов по окраске глаз [16].

Из представленных в таблице данных следует, что насыщение генотипа высоко приспособленных особей линии *cn* генами мух

дикого типа (как *C-S*, так и *D*), не приводит к каким-либо достоверным изменениям исследуемых признаков. В противоположность этому при замещении генов низко приспособленной линии *vg* генами мух дикого типа (*C-S* и *D*) приспособленность особей значительно возрастает как по признаку плодовитости (на 35% и 28% соответственно) и продолжительности жизни (на 37% и 28% соответственно), так и по теплоустойчивости особей (на 99% и 70% соответственно). При этом показатели теплоустойчивости у мутантов *vg(C-S)* и *vg(D)* положительно коррелируют с термостабильностью их АДГ.

Таблица 3

**Приспособленность мутантов дрозофилы в процессе насыщения их генотипов генами линий дикого типа**

n=200–300

Исследуемые линии и формы	Поколение беккрасса (F <sub>B</sub> )	Компоненты приспособленности		
		Продолжительность жизни (Lt <sub>50</sub> ), дни	Плодовитость, кол-во потомков одной пары	Теплоустойчивость, %
<i>C-S</i>		18,11±1,07	89,95±3,87	90,85±1,97
<i>D</i>		17,34±1,70	85,50±5,15	94,00±1,12
<i>cn</i>		16,48±0,65	78,83±3,96	87,82±2,30
<i>vg</i>		9,26±0,75	60,67±3,64	29,48±2,87
<i>cn (C-S)</i>	5	17,64±0,62	78,21±2,50*	85,26±2,94
	10	18,99±1,25	79,45±2,53*	85,41±2,58
	15	15,90±0,53	85,43±4,43	84,37±3,88
	<b>20</b>	<b>18,81±1,21</b>	<b>85,07±6,09</b>	<b>88,19±3,91</b>
<i>vg (C-S)</i>	5	12,23±0,83* **	58,17±3,75*	46,90±4,57* **
	10	13,50±0,94* **	63,98±2,62*	45,73±3,05* **
	15	13,04±1,16* **	78,28±5,09**	52,92±3,60* **
	<b>20</b>	<b>12,68±0,83* **</b>	<b>82,03±4,73**</b>	<b>58,71±4,88* **</b>
<i>cn (D)</i>	5	15,65±1,05	72,15±5,84*	90,64±3,16
	10	16,52±1,12	73,85±4,57*	88,00±2,04
	15	16,90±0,53	76,09±6,45	90,00±2,02
	<b>20</b>	<b>16,80±0,46</b>	<b>82,42±4,23</b>	<b>93,00±2,64</b>
<i>vg (D)</i>	5	10,28±0,65*	55,52±5,00*	33,77±2,08*
	10	10,24±0,30*	64,17±4,72*	36,00±2,84*
	15	11,03±0,39* **	71,17±5,62* **	45,00±2,47* **
	<b>20</b>	<b>11,81±0,45* **</b>	<b>77,87±5,40**</b>	<b>50,00±3,35* **</b>

\* — Различия достоверны по сравнению с соответствующим показателем мух дикого типа (p<0,05); \*\* — Различия достоверны по сравнению с соответствующей мутантной линией (p<0,05).

В то же время представленные данные свидетельствуют о том, что даже после двадцати беккроссов такие показатели приспособ-

ленности, как продолжительность жизни и теплоустойчивость особей, не достигли уровня, характерного для мух дикого типа *C-S* и *D*. Этот факт подтверждает существующее мнение о негативном влиянии мутации *vg* на жизнеспособность дрозофилы [17, 18]. Вместе с тем, результаты, полученные при исследовании продолжительности жизни, плодовитости и теплоустойчивости форм с замещенными генотипами, свидетельствуют, что низкая приспособленность мух линии *vg* объясняется не только действием маркерной мутации, но и влиянием других модифицирующих жизнеспособность генов. В частности, разный аллельный контроль АДГ, обеспечивающий различия в электрофоретической подвижности, активности и термостабильности аллозимов жизненно важного фермента дрозофилы, неоднозначно влияет на приспособленность разных линий, мутантных по маркерным генам.

### Выводы

1. Мутантные гены *sn* и *vg* можно рассматривать как гены, модифицирующие экспрессию *Adh*.
2. Анализ продолжительности жизни и теплоустойчивости форм с замещенными генотипами свидетельствует о негативном влиянии мутации *vg* на жизнеспособность дрозофилы.
3. Низкая приспособленность мух линии *vg* объясняется не только действием маркерной мутации, но и влиянием других модифицирующих жизнеспособность генов.

### Литература

1. Luckinbill L. S. Prospective and retrospective tests of evolutionary theories of senescence // Arch. Gerontology and Geriatrics. — 1993. — Vol. 16, N 1. — P. 17–32.
2. Lin Y. J., Seroude L., Benzer S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah // Science. — 1998. — Vol. 282, N 5390. — P. 943.
3. Воробьева Л. И., Шахбазов В. Г. Зависимость проявления гетерозиса от степени гетерозиготности мутантных линий *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1988. — Т. 24, № 2. — С. 267–273.
4. Кирпиченко Т. В., Страшнюк В. Ю., Воробьева Л. И., Шахбазов В. Г. Влияние генотипа на экспрессивность признака *vestigial* и степень политении хромосом *Drosophila melanogaster Meig* // Генетика. — 2002. — Т. 38, № 12. — С. 1621–1625.
5. Тоцкий В. Н., Хаустова Н. Д., Моргун С. В., Левчук Л. В. Ген-энзимная система алкогольдегидрогеназы при изменениях генотипа у *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. — 1998. — Т. 70, № 5. — С. 42–51.
6. Хаустова Н. Д., Моргун С. В. Ген-энзимная система АДГ и приспособленность мутантов *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1999. — Т. 35, № 5. — С. 600–605.
7. Коренева Л. Г., Гроссман А. И. Генетическая вариабельность  $\alpha$ -глице-рофосфатдегидрогеназы у *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1970. — Т. 6, № 6. — С. 126–128.
8. Ornstein L. Disk electrophoresis. I. Background and theory // Ann. N. Y. Acad. Sci. USA. — 1964. — Vol. 121. — P. 321–349.
9. McKechnie S. W., Geer B. W. // Insect. Biochem. — 1984. — Vol. 14, N 2. — P. 231–242.
10. Chambers O. K., Wilks A. V., Gibson J. B. // Biochem. Genet. — 1984. — Vol. 22, N 1–2. — P. 153–168.

11. Хаустова Н. Д. Локус *Adh Drosophila melanogaster* в условиях отбора на задержку старения // Генетика. — 1995. — Т. 31, № 5. — С. 646–651.
12. Dorado D., Barbancho M. Differential responses in *Drosophila melanogaster* to environmental ethanol: modification of fitness components at *Adh* locus // Heredity. — 1984. — Vol. 53, N 2. — P. 309–320.
13. Некрасова А. В., Шахбазов В. Г. Длительность онтогенеза и возрастные изменения плодовитости и теплоустойчивости *Drosophila melanogaster* в связи с эффектом гетерозиса // Цитология и генетика. — 1981. — Т. 15, № 3. — С. 49–53.
14. Страшнюк В. Ю., Воробьева Л. И., Шахбазов В. Г. Вклад гетерозиготности по хромосоме 2 в эффект гетерозиса у *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1985. — Т. 21, № 11. — С. 1828–1833.
15. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 150 с.
16. Najera C., Menzua S. L. Effect of alcohol and compelition levels on viability of eye colour mutants of *Drosophila melanogaster* // Gen., selec., evol. — 1985. — Vol. 17, N 3. — P. 331–340.
17. Тоцький В. М. Множинний алелізм і генетичні механізми адаптацій природних і штучно створених генотипів. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. — К.: Логос, 2001. — Т. 2. — С. 98–105.
18. Тоцький В. Н., Хаустова Н. Д., Алшибли Н. М., Сечняк А. Л. Генетико-биохимические механизмы онтогенетической и филогенетической адаптации // Цитология и генетика. — 2002. — Т. 36, № 3. — С. 69–75.

#### С. В. Білоконь

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

#### ПРИСТОСОВАНІСТЬ МУТАНТІВ *cn* І *vg* *DROSOPHILA* *MELANOGASTER* В ДИНАМІЦІ ЗАМІЩЕННЯ ЇХ ГЕНОТИПІВ

##### Резюме

Вивчали пристосованість і ген-ензимну систему АДГ у мутантів *cn* і *vg*, що розрізняються за алельним контролем ферменту. Для виявлення ролі маркерних мутацій у формуванні досліджуваних ознак *Drosophila melanogaster* провадили насичення генотипів мутантів *cn(Adh<sup>S</sup>)* і *vg(Adh<sup>F</sup>)* генами мух дикого типу *C-S(Adh<sup>S</sup>)* і *D(Adh<sup>F</sup>)*. Аналіз нащадків бекросів у 5-му, 10-му, 15-му і 20-му поколіннях насичуючих схрещувань показав вплив як маркерних мутацій, так і генотипу в цілому на функціональну активність АДГ і пристосованість дрозофіли.

**Ключові слова:** дрозофіла, мутанти, АДГ, пристосованість.



**S. V. Belokon**

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

**THE FITNESS OF *cn* AND *vg* *DROSOPHILA MELANOGASTER*  
MUTANTS IN THE DYNAMICS OF THEIR GENOTYPES  
SUBSTITUTION**

**Summary**

It has been investigated fitness and gene-enzymic ADH system of *cn* and *vg* mutants, which differ in allele control of ferment. For discovery of the role of marker mutations in the formation of features under research of *Drosophila melanogaster*, it was carried out the saturation of mutants' *cn(Adh<sup>S</sup>)* и *vg(Adh<sup>F</sup>)* genotypes with genes of wild types flies *C-S(Adh<sup>S</sup>)* and *D(Adh<sup>F</sup>)*. The analysis of backcross descendents in 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> of generations saturating crossings showed the influence both marker mutations and gene-type in the whole on functional ADH activity and fitness of *Drosophila*.

**Keywords:** *Drosophila*, mutants, ADH, fitness.