

УДК 575.174.015.3:57.045

Д. Б. Радионов¹ зав. лаб.,

А. М. Андриевский² канд. биол. наук, доц., докторант,

Н. Д. Хаустова² канд. биол. наук, доц.,

А. А. Красносельская² магистр.

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,

¹ — лаборатория физико-химических методов исследования,

² — кафедра генетики и молекулярной биологии,

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: pankovae@yandex.ru

АНАЛИЗ ЧАСТОТ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ПО ЛОКУСУ β -ЭСТЕРАЗЫ В ПРИРОДНЫХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Используя метод щелочного электрофореза в полиакриламидном геле, изучали аллозимный состав и определяли частоты встречаемости генотипов и аллелей по локусу β -специфичной карбоксиэстеразы (β -*Est*) в трех природных популяциях *Drosophila melanogaster*, обитающих в Чернобыльской зоне отчуждения, а также в полученных из них лабораторных популяциях, содержащихся в течение сорока поколений при 24 °C и 27 °C. Показаны межпопуляционные различия в частотах аллелей и генотипов по изучаемому локусу. Установлена роль температуры в формировании указанных различий.

Ключевые слова: аллозимы β -специфичной карбоксиэстеразы, частоты аллелей и генотипов по локусу β -*Est*, природные и лабораторные популяции *Drosophila melanogaster*.

Многие исследователи указывают на то, что наличие в тканях различных аллозимов играет важную роль в процессе приспособления организмов к различным факторам окружающей среды. Однако, динамика соотношения конкретных аллозимов при адаптации бионтов к действию определенных экологических факторов, даже у такого модельного объекта как *Drosophila melanogaster*, изучена недостаточно [1–3].

По нашему мнению, при адаптации к изменяющимся внешним условиям важную роль играют гидролитические ферменты, которые выполняют в организме важные функции, в том числе поддержания физиологического баланса различных биологически активных веществ. В связи с этим изучение состояния этих ферментных систем у организмов одного вида, обитающих в разных условиях, является эффективным методом оценивания адаптивных возможностей вида и популяций. Одним из наиболее показательных и в то же время недостаточно изученных ферментов у *Drosophila melanogaster* является β -специфичная эстераза, представленная двумя аллоформами [4].

Цель данной работы — сравнить частоты встречаемости аллелей локуса β -*Est* у мух из исходных природных и полученных из них лабораторных популяций, содержащихся при разных температурных режимах (24 °C и 27 °C) в течение 40 поколений.

Материалы и методы исследования

Для исследования использовали имаго *Drosophila melanogaster*, отобранных в 2007 году из трёх природных популяций, обитающих на территориях Чернобыльской зоны отчуждения (*Водоём — охладитель ЧАЭС*, *Полесская* и *Садовая*). Из них были выведены лабораторные популяции, разводимые методом массовых скрещиваний в течение 40 поколений. При этом лабораторные популяции были разделены на две группы. Развитие мух первой группы происходило при 24 °C, а мух второй группы содержали при 27 °C. В обоих случаях использовали стандартную питательную среду [5].

Для получения экстрактов тканей отдельно взятых 15 самцов и 15 самок (предварительно наркотизированных диэтиловым эфиром) из каждой популяции гомогенизировали в течение 2 мин в 10 мкл глицин-NaOH буфера pH 9,0, содержащего 1 % тритона X-100. Гомогенаты центрифугировали при 10 000 g в течение 15 минут при +4 °C. К полученным экстрактам добавляли 5 мкл 0,01 % раствора бромфенолового синего, приготовленного на 60 % растворе сахарозы, после чего их подвергали электрофоретическому разделению в системе щелочного (pH 8,3) вертикально-пластинчатого 7,5 % полиакриламидного геля. После электрофореза гелевые блоки отмывали дистиллированной водой. Наличие молекулярных форм эстераз определяли с помощью гистохимической реакции азосочетания продуктов расщепления α - и β -нафтилацетатов с солью диазония (прочным синим) в среде (25 мл) 0,1 M трис-глицинового буфера pH 7,4. Через 20 минут инкубации ферменты инактивировали термической обработкой. Находящиеся в гелевом блоке аллозимы β -специфичной карбоксиэстеразы идентифицировали при помощи лицензионной компьютерной программы “АнаИС” (Поджарский, Рыбалка, 2004, Украина). Теоретически ожидаемые частоты генотипов и аллелей по локусу β -Est рассчитывали по формуле Харди — Вайнберга. Статистическую обработку полученных данных проводили, пользуясь компьютерной программой “Excel” из пакета “MS Office” и специальным руководством [6].

Результаты исследования и обсуждение

Анализ частот встречаемости *F*- и *S*-аллозимов β -специфичной карбоксиэстеразы у *Drosophila melanogaster* из природных популяций (рис. 1 А, 1 Б) показал наличие гетерогенности по локусу β -Est. Исключение составила только природная популяция *Садовая* и соответственно полученные из неё лабораторные популяции, где частота генотипа β -Est^S / β -Est^S во всех случаях составляла 100 %. Об этом свидетельствует тот факт, что у мух указанных популяций отсутствовал *F*-аллозим β -эстеразы (рис. 1 В).

В других природных популяциях из Чернобыльской зоны отчуждения частоты встречаемости генотипов по исследуемому локусу значительно отличались друг от друга. Так в *Полесской* популяции частота гетерозигот β -Est^S / β -Est^F и гомозигот β -Est^S / β -Est^S была одинаковой, соотношение

указанных генотипов составляло 1,0. Интересен тот факт, что гомозигот по аллелю, кодирующему *F*-алозим, т. е. генотипов $\beta\text{-Est}^F / \beta\text{-Est}^F$, среди мух, отобранных из природной популяции, вообще не было обнаружено (рис. 1 Б). В то же время в популяции, обитающей на берегу водоёма — охладителя ЧАЭС, частота генотипа $\beta\text{-Est}^F / \beta\text{-Est}^F$ была максимальной и достигала 0,53 (рис. 1 А). Частоты других генотипов были значительно ниже и составляли 0,40 и 0,07 для гетерозигот и гомозигот по *S*-аллелю соответственно.

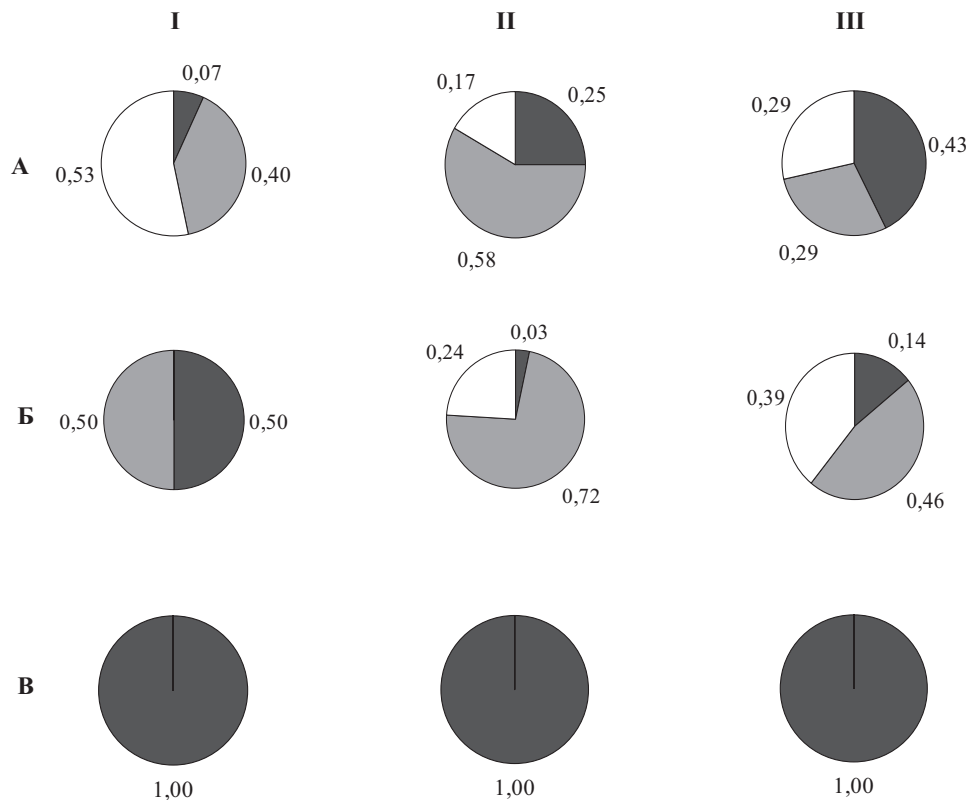


Рис. 1. Наблюдаемые частоты встречаемости генотипов по локусу β -карбоксиэстеразы в природных и лабораторных популяциях *Drosophila melanogaster*. Популяции: А — Водоём — охладитель ЧАЭС, Б — Полеская, В — Садовая; I — исходные природные популяции, II — лабораторные популяции, содержащиеся при 24 °C, III — лабораторные популяции, содержащиеся при 27 °C; ■ — частоты генотипа $\beta\text{-Est}^S / \beta\text{-Est}^S$, ■ — частоты генотипа $\beta\text{-Est}^S / \beta\text{-Est}^F$, □ — частоты генотипа $\beta\text{-Est}^F / \beta\text{-Est}^F$.

Содержание мух в лабораторных условиях при разных стабильных температурах в течение 40 поколений существенно сказалось на динамике частот генотипов. Так, при постоянном культивировании при 24 °C в лабораторных популяциях *Drosophila melanogaster*, полученных из природных

популяций *Водоём — охладитель ЧАЭС* и *Полеская*, частота гетерозигот по локусу β -Est значительно возросла: с 0,40 до 0,58, и с 0,50 до 0,73 соответственно (рис. 1 А, Б). В изменениях частот других генотипов относительно их частот в исходных популяциях чёткой тенденции нами не замечено. Так, в лабораторной популяции, полученной от мух *Полеской* популяции, наблюдалось появление гомозигот Est^F / β -Est^F (частота 0,24) и значительное снижение частоты встречаемости мух с генотипом β -Est^S / β -Est^S (с 0,50 до 0,03). В то же время в лабораторной популяции, полученной из мух, обитающих на берегу водоёма-охладителя ЧАЭС, по сравнению с исходной природной популяцией наблюдается снижение частот встречаемости гомозигот, содержащих F-аллозим, и повышение частот встречаемости гомозигот, продуцирующих S-аллозим.

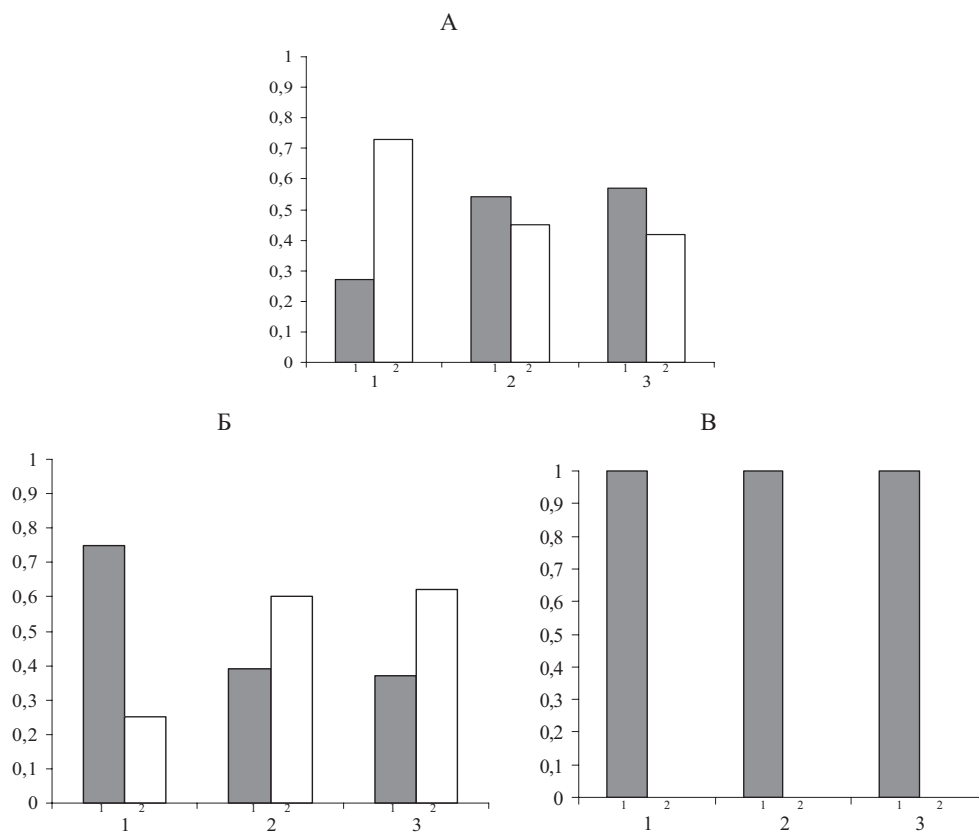


Рис. 2. Частоты встречаемости аллелей локуса β -эстеразы в природных и лабораторных популяциях *Drosophila melanogaster*, развивавшихся при различных температурах. Популяции: А — *Водоём — охладитель ЧАЭС*, Б — *Полеская*, В — *Садовая*; 1 — исходные природные популяции, 2 — лабораторные популяции, содержащиеся при 24 °C, 3 — лабораторные популяции, содержащиеся при 27 °C; 1 — частота S-аллеля, 2 — частота F-аллеля

Содержание мух при 27 °С, наоборот, привело к снижению количества гетерозигот в анализируемой выборке (частота для мух *Полесской* популяции снизилась с 0,50 до 0,46, а для мух популяции *Водоём — охладитель ЧАЭС* — с 0,40 до 0,29). Однако, при этом наблюдалась различная тенденция в изменении встречаемости гомозигот в двух исследуемых лабораторных популяциях, происходящих от соответствующих природных популяций. Так, в лабораторной популяции, полученной из мух *Водоём — охладитель ЧАЭС*, частота генотипа $\beta\text{-Est}^F / \beta\text{-Est}^F$ снизилась, тогда как частота генотипа $\beta\text{-Est}^S / \beta\text{-Est}^S$, наоборот, возросла (рис. 1 А). В то же время у популяции, полученной от исходной *Полесской* популяции, изменение частот гомозиготных генотипов было совершенно противоположным: частота генотипа $\beta\text{-Est}^F / \beta\text{-Est}^F$ возросла с 0 до 0,39, а генотипа $\beta\text{-Est}^S / \beta\text{-Est}^S$ уменьшилась до 0,14 (рис. 1 Б). Сравнивая частоты генотипов в лабораторных популяциях, содержащихся при разных температурных режимах, можно отметить что при 27 °С гетерозиготы встречаются значительно реже, чем при 24 °С, тогда как гомозиготы, наоборот, встречаются чаще (рис. 1 А и 1 Б).

Анализируя частоты встречаемости аллелей, кодирующих различные молекулярные формы β -специфичной эстеразы, следует отметить, что в исходных популяциях они значительно отличались друг от друга. Так, в природной популяции *Водоём — охладитель ЧАЭС* частота аллеля $\beta\text{-Est}^F$ значительно превышала частоту аллеля $\beta\text{-Est}^S$ (0,73 и 0,27 соответственно), а в популяции *Полесская* частоты тех же аллелей составляли 0,25 и 0,75 (рис. 2.) Содержание в стабильных лабораторных условиях мух, обитавших изначально вблизи водоёма-охладителя ЧАЭС, привело к снижению частоты аллеля $\beta\text{-Est}^S$ и соответственно увеличению частоты встречаемости аллеля $\beta\text{-Est}^F$ как при 24 °С, так и при 27 °С. Различия частот аллелей между этими двумя лабораторными популяциями оказались незначительными (рис. 2 А), в то время как различия частот встречаемости генотипов по указанному локусу оказались более существенными. Сходным образом в лабораторных популяциях, полученных из исходной *Полесской* популяции, хотя и наблюдается противоположная динамика изменения частот аллелей, а именно снижение частоты встречаемости аллеля $\beta\text{-Est}^S$ и увеличение частоты встречаемости аллеля $\beta\text{-Est}^F$, не наблюдалось достоверных различий в частотах аллелей между популяциями, содержащимися при 24 °С и при 27 °С. В то же время частоты встречаемости генотипов значительно различались (рис. 1 и 2). Очевидно, это отображает механизм адаптации мух к стабильным, но разным температурным условиям.

Важным, на наш взгляд, является подтверждение наличия дополнительной молекулярной формы β -специфичной карбоксиэстеразы у мух популяции *Водоём — охладитель ЧАЭС* [7] с частотой встречаемости 0,14, обладающей наименьшей электрофоретической подвижностью (Rf 0,300). Указанный аллозим обнаружен нами ранее именно в этой популяции мух, и не наблюдается в других природных и лабораторных популяциях *Drosophila melanogaster*.

Выводы

1. Исследуемые природные популяции *Drosophila melanogaster* Водоем — охладитель ЧАЭС и Полесская характеризуются гетерогенностью по локусу β -Est, в то время как популяция Садовая представлена исключительно генотипом β -Est^S / β -Est^S.

2. Содержание мух в лабораторных условиях при стабильных температурах ведёт к изменению частот встречаемости аллелей и генотипов по локусу β -Est.

3. Лабораторные популяции, полученные из природных популяций Водоем — охладитель ЧАЭС и Полесская, содержащиеся при 24 °C и 27 °C, не различаются по частоте встречаемости аллелей β -Est, но различаются по частоте соответствующих генотипов.

Литература

1. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. — М.: Мир, 1977. — 398 с.
2. Захаров И. К., Ваулин О. В., Илинский Ю. Ю. и др. Источники генетической изменчивости в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Вестник ВОГиС. — 2008. — Т. 12, № 1/2. — С. 112–126.
3. Baker A. J. Molecular methods in Ecology. — Blackwell: Oxford, 2000. — 420 p.
4. Андриевский А. М., Тоцкий В. Н. Генетическая структура экспериментальной популяции *Drosophila melanogaster*, полиморфной по локусу β -фильной карбоксиэстеразы // Цитология и генетика. — 2006. — Т. 40, № 6. — С. 3–10.
5. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
6. Рокицкий П. Ф. Введение в статистическую генетику. — Минск: Вышэйшая школа, 1978. — 448 с.
7. Радионов Д. Б., Андриевский А. М., Тоцкий В. Н., Козерецкая И. А. Частоты встречаемости генотипов и аллелей по локусу β -специфичной карбоксиэстеразы в популяциях *Drosophila melanogaster* Украины (в печати).

Д. Б. Радионов¹, О. М. Андриевський²,
Н. Д. Хаустова², Г. О. Красносельська²

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,

¹ — лабораторія фізико-хімічних методів досліджень,

² — кафедра генетики і молекулярної біології,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: pankovae@yandex.ru

**АНАЛІЗ ЧАСТОТ ЗУСТРІЧАЛЬНОСТІ ГЕНОТИПІВ І АЛЕЛІВ
ПО ЛОКУСУ β -СПЕЦИФІЧНОЇ КАРБОКСИЕСТЕРАЗИ
В ПРИРОДНИХ ТА ЛАБОРАТОРНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA
MELANOGASTER***

Резюме

Використовуючи метод лужного електрофорезу в поліакриламідному гелі, вивчали алозимний склад і визначали частоти зустрічальності генотипів та алелів по локусу β -специфічної карбоксиестерази (β -Est) у трьох природних популяціях *Drosophila melanogaster*, що мешкають в Черніобильській зоні відчуження, а також в отриманих з них лабораторних популяціях, які утримувались протягом сорока поколінь при 24 °C і 27 °C. Показані міжпопуляційні відмінності в частотах алелів і генотипів за досліджуванним локусом. Встановлена роль температури у формуванні зазначених розходжень.

Ключові слова: алозими β -специфічної карбоксиестерази, частоти алелів і генотипів по локусу β -Est, природні та лабораторні популяції *Drosophila melanogaster*.

Д. В. Radionov¹, А. М. Andrievsky²,
N. D. Khaustova², А. А. Krasnoselska²

Odessa National Mechnikov University,

¹ — Laboratory of Physico-Chemical Study,

² — Department of Genetics and Molecular Biology,

Dvoryanskaya Str., 2, Odessa, 65082, Ukraine, e-mail: pankovae@yandex.ru

**ANALYSIS OF THE FREQUENCY OF GENOTYPES AND ALLELE AT
LOCUS OF β -SPECIFIC CARBOXYLESTERASE IN NATURAL AND
LABORATORY POPULATIONS' OF *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Summary

Using the method of alkaline polyacrylamide gel electrophoresis we have studied alleles composition and have determined the frequency of genotypes and alleles of β -specific carboxylesterase in three natural populations of *Drosophila melanogaster* from Chernobyl estrangement zone. We have also got from these natural groups of flies laboratory populations that have been kept during 40 generations in 24 °C and 27 °C. Inter-population differences in frequencies of genotypes and alleles at locus β -Est have been shown. The role of temperature in forming this differences have been determined.

Key words: allozymes of β -specific carboxylesterase, the frequency of alleles and genotypes at locus β -Est, natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*.