

УДК: 575.3:577.222:595.773.4

Н. Д. Хаустова, канд. биол. наук, доц., **В. Н. Тоцкий**, д-р биол. наук, профессор, зав. каф., **Нассер Мох`д Юсеф Ал-Шибли**, асп.,

Н. А. Стрельцова, инж.

Одесский национальный университет,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина
e-mail: caphgen_onu@mail.ru

ЧАСТОТА РЕКОМБИНАЦИЙ И ПРИСПОСОБЛЕННОСТЬ ДРОЗОФИЛЫ ПРИ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЙКАХ ГЕНОТИПА

Изучали состояние компонентов приспособленности и частоту кроссинговера на участке $b - cn - vg$ в зависимости от возраста дрозофилы, условий содержания и осуществленных перестроек генотипа. Обнаружено, что тройные мутанты $b\ cn\ vg$ уступают мухам дикого типа по всем исследованным показателям приспособленности. Возрастные изменения компонентов приспособленности у исследованных мутантов более значительны, чем у мух дикого типа $C-S$. Установлено, что искусственное объединение в генотипе хромосом и генов разного происхождения существенно влияет на адаптивный потенциал особей и частоту рекомбинаций между генами b и cn . Выявлено определенное сходство в направленности изменений отдельных изученных показателей, наблюдаемых у мутантов $b\ cn\ vg$ при их старении и искусственных изменениях генотипа.

Ключевые слова: дрозофила, генотип, компоненты приспособленности, возраст, кроссинговер, мутации.

Структурные и функциональные изменения генотипа, наступающие в ходе онтогенеза или филогенеза, могут существенно влиять на приспособленность организмов [1, 2]. Не исключено, что при старении и при искусственных перестройках генотипов могут наблюдаться сходные функциональные изменения генетического аппарата, вызванные снижением его стабильности и нарушением генного баланса. Можно ожидать определенного сходства и в динамике адаптаций генотипов при их старении и искусственных модификациях.

Анализ литературы свидетельствует, что приспособленность организмов с искусственно измененными генотипами исследована мало [3—6]. Вместе с тем широкое использование в генетике и селекции методов клеточной и генетической инженерии, а также межвидовых и насыщающих скрещиваний побуждает к изучению влияния структурных перестроек геномов и генотипов на приспособленность живых объектов.

Целью данной работы было изучение изменений частоты кроссинговера и состояния основных компонентов приспособленности в онто-

генезе *Drosophila melanogaster* при экспериментальных перестройках генотипа.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили на изосамочьих линиях *Drosophila melanogaster*, гомозиготных по хромосоме 2, где локализованы маркерные мутации *b*, *cn*, *vg*. Исследовали одинарных, двойных и тройных мутантов, мух дикого типа *Canton-S* (*C-S*), а также искусственно синтезированные формы *b cn vg* (*C-S*) и *b cn vg* (*1 C-S*). Структурные перестройки генотипа тройных мутантов осуществляли путем насыщающих и направленных скрещиваний [7], схемы которых представлены ранее [8].

Реальную плодовитость определяли по числу потомков (имаго) одной пары мух, содержащейся в пробирке (20 мл) на протяжении 3-х дней [9].

Для определения *теплоустойчивости* мух подвергали действию сублетальной температуры (L_{150} для дикого типа). В пробирки помещали по 10 особей каждого пола и прогревали их в водном термостате 15 мин при 41 °С. По истечению суток вели учет выживших особей. Теплоустойчивость выражали в процентах отношением числа выживших мух к числу прогретых [10, 11].

Выживаемость мух при голодании определяли, помещая их в пробирки без корма (по 10 особей каждого пола). Подсчет выживших мух в течение первых суток нахождения на голодной диете проводили через каждые 6 часов, а в дальнейшем через каждые 3 часа до полной гибели мух в каждой пробирке и выражали в часах, на которые пришлось гибель 50% мух.

Продолжительность жизни мух на стандартной среде и при добавлении в корм этанола (10%) 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 пришлось гибель 50% мух (L_{150}) [12].

Частоту кроссинговера определяли по количеству рекомбинантных потомков F_a , полученных в анализирующем скрещивании тригетерозигот по маркерным генам *b cn vg*, и выражали в процентах.

Получение тригетерозигот, постановку анализирующих скрещиваний и учет кроссоверных классов осуществляли по общепринятым схемам [13—15].

Результаты исследований и их анализ

О приспособленности дрозофилы судили по плодовитости, продолжительности жизни и выживаемости в экстремальных условиях мух разного возраста.

Результаты анализа, представленные в таблице 1, свидетельствуют о различной плодовитости у исследованных возрастных групп мутантов.

Исключение составляют мухи дикого типа, обладающие максимальной плодовитостью, не изменяющейся в течение анализируемого периода. Все мутанты проявили большую плодовитость в раннем возрасте. Более плодовитыми оказались мухи линий *b*, *cn*, *cn vg*, менее плодовитыми — линий *vg*, *b cn*, *b vg* и *b cn vg*.

Таблица 1

**Плодовитость исследуемых линий дрозофилы в зависимости от
возраста особей, количество потомков одной пары
п=20—40 семей**

Линии	Возраст, дни	
	2 – 5	6 – 9
<i>C-S</i>	48.30 ± 1.30	52.30 ± 1.98
<i>b</i>	$34.40 \pm 0.85 \diamond$	$28.60 \pm 1.66 * \diamond$
<i>cn</i>	$43.70 \pm 1.36 \diamond$	$30.20 \pm 0.80 * \diamond$
<i>vg</i>	$27.40 \pm 0.52 \diamond$	$16.40 \pm 0.46 * \diamond$
<i>b cn</i>	$28.90 \pm 0.70 \diamond$	$24.10 \pm 0.46 * \diamond$
<i>b vg</i>	$26.30 \pm 0.59 \diamond$	$20.70 \pm 0.43 * \diamond$
<i>cn vg</i>	$36.00 \pm 0.39 \diamond$	$33.60 \pm 0.35 * \diamond$
<i>b cn vg</i>	$23.10 \pm 0.38 \diamond$	$19.90 \pm 0.43 * \diamond$

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с мухами 2—5-дневного возраста. $\diamond$ — различия достоверны по сравнению с линией *C-S*

Выявлению различающихся по приспособленности генотипов способствовали экстремальные условия (гипертермия, голодание), создаваемые в эксперименте. Результаты анализа выживаемости дрозофилы в условиях теплового шока представлены в таблице 2.

Теплоустойчивость значительно варьировала в зависимости от возраста особей. Более чувствительными к действию сублетальной температуры оказались старые мухи. Наиболее ярко эти различия проявились у мутантов *vg* и *b cn vg*. При содержании в условиях голодания самыми чувствительными оказались самцы линий *cn* и *b cn vg* (табл. 3).

Оценивая продолжительность жизни мух исследуемых линий (табл. 4), следует отметить, что наименьшая продолжительность жизни свойственна мутантам *vg* и *b cn vg*. У этих мух продолжительность жизни вдвое меньше таковой по сравнению с линией *C-S*. Добавление в корм этанола в большинстве случаев значительно удлиняло среднюю продолжительность жизни мух. Межлинейные различия при этом сохранялись.

Таблица 2

**Выживаемость линейных мух разного возраста в условиях
гипертермии (41 °С, 15 мин), % выживших мух
n = 20**

Линии	Возраст, дни		
	1	5	15
<i>C-S</i>	63.69 ± 1.06 *	50.08 ± 1.32	15.56 ± 1.40 *
<i>b</i>	65.44 ± 2.15 *	52.17 ± 1.29	18.20 ± 1.90 *
<i>cn</i>	63.30 ± 1.42 *	51.58 ± 1.68	17.47 ± 1.95 *
<i>vg</i>	60.60 ± 3.08 *	37.42 ± 2.04 ◇	5.53 ± 0.87 * ◇
<i>b cn vg</i>	60.37 ± 3.83 *	42.95 ± 1.80 ◇	3.75 ± 0.71 * ◇

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с мухами 5-дневного возраста. ◇ — различия достоверны по сравнению с линией *C-S*

В конечном итоге сравнительный анализ компонентов приспособленности мух позволил выявить среди исследованных линий высокоприспособленную — *C-S* и низкоприспособленную — *b cn vg*.

Существует мнение, что частота мейотического кроссинговера может отражать не только уровень комбинационной изменчивости генотипов, но и степень их адаптивности в конкретных условиях внешней среды [2]. Исходя из этого, мы исследовали частоту кроссинговера на участке *b-cn-vg* у мутантных мух при их старении и искусственных изменениях генотипа.

Модификацию низкоприспособленного генотипа *b cn vg* осуществляли путем его насыщения генами высокоприспособленной линии *C-S* и замещения собственной X-хромосомы на аналогичную хромосому дикого типа [7].

Оказалось, что максимальная рекомбинационная активность свойственна мухам молодого возраста. В последующие сроки жизни (4—12 дней) частота кроссинговера устанавливается на более низком уровне, соответствующем значениям генетических карт. Однако у старых мух (23—26-дневных) наблюдали увеличение частоты кроссинговера (табл. 5). Распределение перекрестов между генами *b-cn*

и *cn-vg* было неравномерным, особенно у стареющих и старых мух. Меньшая частота кроссоверов на участке *b-cn*, возможно, объясняется его прицентромерной локализацией.

Таблица 3

Выживаемость 5-дневных самок и самцов исследуемых линий
при голодании, часы (L_{t50})
 $n = 25-40$

Линии	Самки	Самцы	Самки и самцы
<i>C-S</i>	$47.36 \pm 2.51^*$	38.60 ± 2.18	42.98 ± 2.21
<i>b</i>	$65.08 \pm 2.32^* \diamond$	$49.44 \pm 1.80 \diamond$	$57.26 \pm 2.57 \diamond$
<i>cn</i>	$42.92 \pm 1.90^*$	$29.16 \pm 1.62 \diamond$	$36.04 \pm 1.51 \diamond$
<i>vg</i>	$62.44 \pm 2.38^* \diamond$	$53.96 \pm 2.66 \diamond$	$58.20 \pm 2.22 \diamond$
<i>cn vg</i>	$51.90 \pm 2.50^*$	44.28 ± 2.26	48.64 ± 2.01
<i>b cn vg</i>	$44.80 \pm 1.20^*$	$29.24 \pm 1.26^* \diamond$	$37.02 \pm 1.74 \diamond$

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с самцами той же линии.
 $\diamond$ — различия достоверны по сравнению с линией *C-S*

Частота кроссинговера как у мух, полученных в результате насыщающих скрещиваний, так и у мух, полученных путем межлинейных замещений X-хромосомы, достоверно увеличена по сравнению с исходными тройными мутантами (табл. 6), при этом повышение рекомбинационной активности на участке *b-cn-vg* у мух с модифицированными генотипами связано в первую очередь с увеличением частоты перекрестов между генами *b* и *cn*.

Увеличение интенсивности кроссинговера у старых мух и у мух с модифицированными генотипами можно объяснить определенной нестабильностью этих генотипов из-за измененного генного баланса, что особенно вероятно при введении в генотип чужеродного генетического материала.

Вполне возможно, что при этих условиях облегчаются и становятся более частыми разрывы хроматид, особенно в местах скопления гетерохроматина.

Интересно сопоставить частоту рекомбинационных процессов у исследуемых мух с показателями их приспособленности (табл. 7).

Таблица 4

Продолжительность жизни мух исследуемых линий при разных условиях их содержания, дни (L_{150})
 $n = 20-80$

Линии	Условия содержания	
	Стандарная среда (контроль)	Среда с этанолом (10 %)
<i>C-S</i>	10.16 ± 0.64	$25.46 \pm 1.07 *$
<i>b</i>	12.96 ± 1.32	$21.50 \pm 1.17 *$
<i>cn</i>	8.26 ± 0.33	$23.65 \pm 1.15 *$
<i>vg</i>	$5.30 \pm 0.26 \diamond$	$6.10 \pm 0.47 \diamond$
<i>b cn vg</i>	$5.00 \pm 0.97 \diamond$	$9.56 \pm 0.74 * \diamond$

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем. $\diamond$ — различия достоверны по сравнению с линией *C-S*

Как насыщение генотипа *b cn vg* генами мух *C-S*, так и введение хромосомы 1 мух дикого типа удлиняло сроки жизни голодающих мутантов *b cn vg* практически до уровня этого показателя у линии *C-S*. Увеличивалась также продолжительность жизни мух с замещенным генотипом при стандартных условиях их содержания. Что касается теплоустойчивости, то достоверное повышение этого показателя обнаружено только при замещении хромосомы 1. Наименее изменчивым в условиях опытов оказался один из основных показателей приспособленности — плодовитость особей. По-видимому, морфологические и физиологические изменения фенотипа мутантов *b cn vg*, обусловленные плеiotропным действием мутаций, оказывают существенное негативное влияние на формирование уровня репродуктивной способности этих мух.

В заключение следует отметить, что суммарный эффект маркерных мутаций зависит от возраста мух, температурных и диетических условий их содержания, а также от структурных особенностей генотипа.

Опыты на тройном мутанте *b cn vg* показали, что старение мух и искусственное вмешательство в их генотип могут сходным образом повышать частоту кроссинговера на участке *b-cn-vg*.

Таблица 5

**Частота кроссинговера на исследуемом участке хромосомы 2
разновозрастных мутантов *b cn vg*, %
n = 15—20 семей**

Участок хромосомы 2	Возраст самок, дни				
	1 – 3	4 – 6	7 – 9	10 – 12	23 – 26
<i>b - cn</i>	15.23± 2.48 *	7.42± 1.21 ◇	7.91± 1.11	8.63± 1.04 ◇	12.20± 1.50 * ◇
<i>cn - vg</i>	18.21± 0.81 *	12.55± 1.38	10.52± 1.25	13.88± 1.26	16.71± 1.08 *
<i>b - vg</i>	33.44± 3.84 *	19.97± 1.44	18.43± 1.57	22.51± 1.91	30.6± 1.71 *

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с соответствующим показателем у мух 7—9-дневного возраста. ◇-частота кроссинговера на участке *b — cn* достоверно отличается от частоты кроссинговера на участке *cn — vg*

Таблица 6

**Частота кроссинговера (%) у пятидневного мутанта *b cn vg* при
искусственных изменениях структуры генотипа
n = 15—20 семей**

Участок хромосомы 2	Исследуемые мутанты		
	<i>b cn vg</i>	<i>b cn vg (C-S)</i>	<i>b cn vg (I C-S)</i>
<i>b - cn</i>	7.42 ± 1.21	13.64 ± 1.74 *	11.53 ± 1.00 *
<i>cn - vg</i>	12.55 ± 1.38	13.93 ± 1.20	12.46 ± 1.17
<i>b - vg</i>	19.97 ± 1.44	27.57 ± 1.85 *	23.99 ± 1.30 *

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с линией *b cn vg*

Положительный эффект искусственных модификаций генотипа тройных мутантов, проявляющийся в отдельных фенотипических признаках, можно связать с особенностями внедренных генов дикого типа, имеющих более высокий адаптивный потенциал, чем собственные гены мутанта.

Таблица 7

**Компоненты приспособленности исходных линий дрозофилы и форм
с измененными генотипами**
n = 20—80

Показатели приспособленности	Исследуемые формы			
	<i>C-S</i>	<i>b cn vg</i>	<i>b cn vg</i> (<i>C-S</i>)	<i>b cn vg</i> (<i>1 C-S</i>)
Плодовитость, количество потомков одной пары 5-дневных мух	49.01± 3.21 *	23.87± 1.15	20.94± 1.24	24.20± 1.71
Продолжительность жизни (<i>L₁₅₀</i>), дни	11.99± 0.85*	6.31± 0.57	11.89± 0.82 *	7.84± 0.66
Продолжительность жизни при голодании (<i>L₁₅₀</i>), часы	42.98± 2.21*	37.02± 1.74	44.20± 1.44 *	43.31± 1.67 *
Теплоустойчивость 5-дневных мух. %	50.08± 1.32 *	42.95± 1.80	41.97± 2.25	50.29± 1.37 *

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с линией *b cn vg*

Негативные сдвиги, обнаруженные со стороны рекомбинационных процессов при искусственных перестройках генотипов, можно объяснить нестабильностью последних, возникающей при внедрении чужеродного генетического материала.

Все вышеизложенное следует учитывать в селекции при создании форм с замещенными хромосомами, при генно-инженерных преобразованиях генотипов, а также при разработке генетических теорий развития и старения.

Выводы

1. Приспособленность, определяемая по плодовитости, продолжительности жизни и устойчивости к экстремальным факторам, варьирует у исследованных линий мух в зависимости от генотипа и возраста особей.
2. Тройные мутанты *b cn vg* уступают мухам дикого типа по всем исследованным показателям приспособленности.
3. Замещение хромосомы 1 и насыщение генотипов тройных мутантов генами линии *C-S* приводят к повышению рекомбинационной активности и увеличению приспособленности.

Література

1. Тоцький В. Н., Хаустова Н. Д., Алшиблі Н. М., Сечняк А. Л. Генетико-біохімічні механізми онтогенетическої і філогенетическої адаптації // Цитологія і генетика. — 2002. — Т. 36. — № 3. — С. 69—75.
2. Жученко А. А. Екологічна генетика культурних рослин. — Кишинів: Штиинца, 1980. — 583 с.
3. Тоцький В. Н., Хаустова Н. Д., Моргун С. В., Левчук Л. В. Ген-ензимна система алкоголь-дегідрогенази при заміщенні хромосом і інших змінах генотипу у *Drosophila melanogaster* // Укр. біохім. журн. — 1998. — Т. 70. — № 5 — С. 42—51.
4. Левчук Л. В., Тоцький В. М. Заміщення хромосом і пристосованість генотипів *Drosophila melanogaster* // Цитологія і генетика. — 1998. — Т. 32. — № 2. — С. 42—48.
5. Хаустова Н. Д., Моргун С. В. Ген-ензимна система АДГ і пристосованість мутантів *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1999. — Т. 35. — № 5 — С. 600—605.
6. Моргун С. В., Левчук Л. В. Пристосованість *Drosophila melanogaster* за штучних змін генотипів // Вісник Одеського державного університету. — 1999. — Т. 3. — Вип. 4. — С. 36—40.
7. Luckinbill L. S., Graves J. L., Reed A. H., Koetsawang S. Localizing genes that defer senescence in *Drosophila melanogaster* // Heredity. — 1988. — Vol. 60. — № 3. — P. 367—374.
8. Хаустова Н. Д., Алшиблі Насер, Тоцький В. Н., Блажнова Е. В. Частота рекомбінацій як показатель генного балансу і пристосованості дрозофіли // Вісник Одеського національного університету. — 2003. — Т. 8. — Вип. 1. — С. 86—92.
9. Хаустова Н. Д. Лocus *Adh* *Drosophila melanogaster* в умовах відбору на затримку старіння // Генетика. — 1995. — Т. 31. — № 5. — С. 646—651.
10. Некрасова А. В., Шахбазов В. Г. Довготривалість онтогенезу і вікові зміни плодовитості і теплоустійливості *Drosophila melanogaster* в зв'язі з ефектом гетерозису // Цитологія і генетика. — 1981. — Т. 15. — № 3. — С. 49—53.
11. Страшнюк В. Ю., Вороб'єва Л. І., Шахбазов В. Г. Вклад гетерозиготності по хромосомі 2 в ефект гетерозису у *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1985. — Т. 21. — № 11. — С. 1828—1833.
12. Dorado G., Barbancho M. Differential responses in *D. melanogaster* to environmental ethanol: modification of fitness components at *Adh* locus // Heredity. — 1984 — Vol. 53 — № 2. — P. 309—320.
13. Медведєв Н. Н. Практична генетика. — М.: Наука, 1968. — 293 с.
14. Лобашев М. Е. Генетика. — Л.: ЛГУ, 1967. — 750 с.
15. Тоцький В. М. Генетика. — Одеса: Астропринт, 2002. — 709 с.

Н. Д. Хаустова, В. М. Тоцький, Нассер Мох`д Юсеф Ал-Шіблі,
Н. А. Стрельцова

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

ЧАСТОТА РЕКОМБІНАЦІЙ І ПРИСТОСОВАНІСТЬ ДРОЗОФІЛИ ЗА СТРУКТУРНИХ ПЕРЕБУДОВ ГЕНОТИПУ

Резюме

Отримано дані про стан компонентів пристосованості у різних мутантних ліній *Drosophila melanogaster*, а також про частоту кросинговеру на ділянці *b - cn - vg* залежно від віку мух, умов їх утримання й штучно здійснених перебудов генотипу. Показано, що вікові зміни компонентів пристосованості у досліджуваних носіїв мутантних генів більш значні, ніж у мух дикого типу *C - S*. Встановлено, що насичення генотипу мутанта *b cn vg* генами мух *C - S* або заміщення його хромосоми

1 на гомологічну хромосому мух *C-S* супроводжується підвищенням частоти кросинговеру на ділянці *b - cn - vg*.

Ключові слова: дрозофіла, генотип, компоненти пристосованості, вік, кросинговер, мутації.

N. D. Khaustova, V. N. Totsky, Nasser Moh'd Usef Al-Shibly,

N. A. Streltsova

Odessa National I. I. Mechnikov University,

Department of Genetics and Molecular Biology,

Dvoryanskaya Str., 2, Odessa, 65026, Ukraine.

RECOMBINATION FREQUENCY AND FITNESS OF DROSOPHILA UNDER THE STRUCTURAL REORGANIZATIONS OF A GENOTYPE

Summary

It was determined that saturation of the mutant genotype *b cn vg* by the genes of flies *C - S* or the displacement of its chromosome 1 on a homologous chromosome of flies *C - S* leads to increasing of the frequency of the crossing over in the field *b - cn - vg*. Thus the frequency of the crossing over under the artificial changes of the genotype increases in the field *b - cn*, but does not change in the field *cn - vg*. It is shown that the age changes of the fitness components for the investigated bearers of the mutant genes are more significant than for flies of the wild type *C - S*. The proofs of availability in the genotype of flies of the line *C - S* genes which are capable to improve the parameters of fitness components for the mutants *b cn vg* are obtained

Keywords: *Drosophila*, the genotype, fitness components, age, crossing over, mutations.