

Д.Б. РАДІОНОВ¹, О.В. ПРОЦЕНКО²,
О.М. АНДРІЄВСЬКИЙ¹, В.М. ТОЦЬКИЙ¹,
В.О. КУЧЕРОВ¹, І.А. КОЗЕРЕЦЬКА²

¹ Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
² Київський національний університет імені Тараса Шевченка
E-mail: iryna.kozeretska@gmail.com

СТАБІЛЬНІСТЬ ГЕНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ В ПОПУЛЯЦІЇ *DROSOPHILA MELANOGASTER* м. ОДЕСИ



Встановлено, що частоти алелів гена карбоксиестерази, а також зчеплених з X-хромосомою летальних мутацій та рекомбінаційних подій у представників природної популяції *Drosophila melanogaster* м. Одеси були незмінними в червні, липні та серпні сезону 2009 року збору.

© Д.Б. РАДІОНОВ, О.В. ПРОЦЕНКО, О.М. АНДРІЄВСЬКИЙ,
В.М. ТОЦЬКИЙ, В.О. КУЧЕРОВ, І.А. КОЗЕРЕЦЬКА, 2011

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2011. № 3

Вступ. Генетична структура популяцій визначається законами спадковості та мінливості, якими вона детермінується. Генетична мінливість популяцій складається із двох компонент: 1) накопичена в еволюційному процесі та збережена в природній популяції генетична мінливість; 2) мутації в репродуктивному поколінні, що виникли *de novo*, або діючий мутаційний процес, який визначає сучасний спектр мутацій та швидкість мутування [1]. Отже, спектр та частоти алелів в популяції не визначають повною мірою генетичний поліморфізм цієї популяції, але виступають вихідним матеріалом для його формування в процесах рекомбінації, яка постійно відбувається за розмноження та розвитку багатоклітинних організмів. Зміни цих процесів та їхніх частот відображають відповідь біологічних систем на зміни структури генотипів і вплив факторів оточуючого середовища [2].

Метою дослідження було оцінити ступінь генетичного поліморфізму за локусом гена β -специфічної карбоксиестерази, частоту летальних зчеплених з X-хромосомою мутацій та рекомбінаційних подій між генами *white* (*w*, 1–1,5) і *cut* (*ct*, 1–20) у представників природної популяції *Drosophila melanogaster* м. Одеси.

Матеріал та методи. Матеріалом для роботи слугували особини *D. melanogaster* з природної популяції міста Одеси, відібрані у 2009 р. на початку (червень), в середині (липень) і в кінці (серпень) сезону основної активності цього виду. Збір мух проводили з 10 по 15 число кожного з вказаних місяців на гідробіологічній станції Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова. Обсяг вибірки становив 230–250 особин.

Для отримання екстрактів тканин окремих самців та самок із популяції (по 15 особин кожної статі) гомогенізували протягом 2 хв в 10 мкл гліцин-NaOH буфера рН 9,0, який містив 1 % тритону X-100. Гомогенати центрифугували при 10 000 g впродовж 15 хв при +4 °С. До отриманих екстрактів додавали 5 мкл 0,01 % розчину бромфенолового синього, піддавали їх електрофоретичному розподілу в системі лужного (рН 8,3) вертикально-пластинчастого 7,5%-ного поліакриламідного гелю, після чого гелеві блоки відмивали дистильованою водою. Наявність різних молекулярних форм карбоксиестераз визначали за допомогою реакції

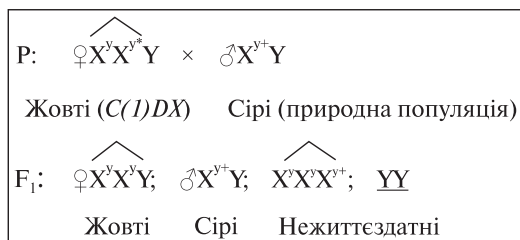


Рис. 1. Схема схрещування досліджуваних мух: у – мутація гена *yellow* (1–0.0), якою марковано зчеплені X-хромосоми *D. melanogaster*

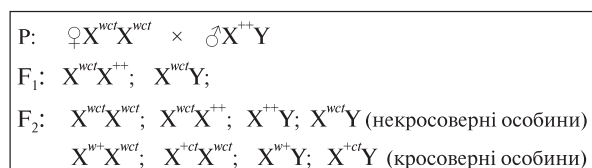


Рис. 2. Схема проведення тесту на частоту генетичної рекомбінації в X-хромосомах *D. melanogaster* між генами *white* (*w*, 1–1,5) і *cut* (*ct*, 1–20)

азосполучення продуктів розщеплення α - і β -нафтилацетатів з сіллю діазонію, використовуючи як інкубаційне середовище 25 мл 0,1 М трис-гліцинового буфера рН 7,4. Через 20 хв інкубації ферменти інактивували термічною обробкою. Алозими ферменту (швидкий (*F*) та повільний (*S*)) диференціювали за показниками *Rf*.

Для оцінки спонтанного рівня летальних зчеплених X-хромосою мутацій самців із природної популяції (10 особин) схрещували попарно з віргінними самками лінії *C(1)DX* зі зчепленими X-хромосомами і аналізували нащадків F_1 . Наявність летальних зчеплених зі статтю мутацій ідентифікували за відхиленням у першому поколінні співвідношення самців і самок порівняно з контролем. Контролем слугували самці лабораторної лінії *Canton S*, яких також схрещували з самками лінії *C(1)DX* за схемою, наведеною на рис. 1.

Для визначення частоти рекомбінаційних подій в X-хромосомі на ділянці між генами *white* і *cut* самців з природної популяції схрещували з віргінними самками лінії *w ct* (по 10 самців).

Нащадків першого покоління схрещували між собою. Частоту кросинговеру оцінювали, розраховуючи співвідношення рекомбінант-

них класів *w* і *ct* серед нащадків схрещування (рис. 2).

Як контроль використовували самців лабораторної лінії *Canton S*, яких також схрещували з самками лінії *w ct*.

Статистичну обробку отриманих даних проводили, використовуючи метод χ^2 [3], за допомогою комп'ютерної програми «Excel» із пакета «MS Office».

Результати дослідження та їхнє обговорення. Аналіз частот алелів β -карбоксиестерази показав, що генопродукти *S*-алеля карбоксиестерази (*Rf* = 0,33) зустрічаються в досліджуваній популяції *D. melanogaster* значно частіше, ніж рухлива *F*-форма (*Rf* = 0,35) цього ферменту (табл. 1). Так, частоти алелів *Est-6^S* та *Est-6^F* на початку літнього сезону становили 0,67 та 0,33 відповідно. Це узгоджується з результатами досліджень [4, 5], згідно з якими частота *S*-алозиму β -специфічної карбоксиестерази в популяціях дрозофіли у помірному поясі значно вища, ніж частота *F*-алозиму.

У серпні частота алеля *Est-6^S* мала тенденцію до зменшення до 0,59, а алеля *Est-6^F* – до збільшення відповідно до 0,41 (табл. 1), однак ця різниця у порівнянні з червнем та липнем виявилася статистично не вірогідною. Франклін [6] на природних популяціях *D. melanogaster* Австралії продемонстрував, що в кінці літа частота більш рухливого алозиму збільшується внаслідок тривалого впливу високих температур. Таким чином, отримані нами попередні дані щодо частот алелів карбоксиестерази у природній популяції не відповідають отриманим Франкліним результатам. Це, можливо, пов'язано з тим, що «кінець» астрального літа на широті м. Одеси припадає не на серпень, або тим, що вплив високих температур був недостатньо тривалим.

В результаті оцінки частоти зчеплених з X-хромосою летальних мутацій шляхом схрещування самок лінії *C(1)DX* з самцями із природної популяції було показано, що зазначений показник не перевищував контрольного рівня в жодний з трьох періодів досліджень (табл. 2).

Раніше проведені дослідження Гершензона [7] та Берг із співавт. [8] продемонстрували наявність 20–30 % летальних мутацій в природних популяціях *D. melanogaster* Києва та Умані.

Слід зазначити, що відмінність у результатах, які отримані нашими попередниками та нами, може пояснюватися перш за все тим, що частота летальних мутацій досліджувалася Берг та ін. [8] у аутозомах, ми ж використали у наших дослідженнях статеву (X) хромосому. Справа у тому, що кожна X-хромосома у виду *D. melanogaster* кожне друге покоління проходить через гемізиготний стан, оскільки самець містить у своєму каріотипі статеві хромосоми X та Y. У випадку летальних мутацій це означає загибель тих самців, які в єдиній X-хромосомі несуть летальні мутації. Рецесивні летальні мутації аутосом можуть підтримуватися значний час у гетерозиготному стані, оскільки не проявлятимуться на фоні аеля дикого типу. Таким чином, кожне друге покоління, через яке проходять X-хромосоми, піддається жорсткому відбору з приводу хромосом, що несуть усі типи летальних мутацій, тоді як насії аутосом відмітаються відбором лише у випадку виникнення домінантних летальних мутацій та виходу рецесивних летальних мутацій у гомозиготу. Саме ця відмінність успадкування статевої (X) хромосоми та аутосом і може бути причиною наявності значної різниці у рівнях летальних мутацій цих хромосом загалом, а отже і у результатах, отриманих нами та нашими попередниками зокрема.

Крім того, у роботі Берг та ін. [8] було продемонстровано збільшення частоти летальних мутацій в середині літнього сезону, що трактувалося як перебування досліджених популяцій в сприятливих умовах існування. Встановлені нами частоти не змінювались протягом всього періоду дослідження. Такі результати можуть знову ж таки бути пов'язані із особливос-

Таблиця 1
Частота алелів S і F β-карбоксиестерази в природній популяції *D. melanogaster* м. Одеси у червні – серпні 2009 р.

Місяці збору комах	Частота алелів, долі одиниці		χ^2
	β -Est-6 ^S	β -Est-6 ^F	
Червень	0,678	0,322	–
Липень	0,676	0,324	0,07
Серпень	0,59	0,41	1,88

Примітка. Кількість проаналізованих мух кожен місяць становила 30 особин.

Таблиця 2
Оцінка коливання частоти зчеплених зі статтю летальних мутацій в природній популяції *D. melanogaster* м. Одеси у 2009 р.

Місяці збору комах	Кількість		χ^2
	самок	самців	
Червень	218	280	2,41
Липень	159	241	0,14
Серпень	241	316	2,21

тями спадкування статевої (X) хромосоми, а також із ступенем розвитку (за думкою Берг та ін. [8]), якого досягала популяція (її чисельність) протягом сезону дослідження.

При дослідженні частоти рекомбінацій в X-хромосомі на ділянці між генами *white* і *cut* у самок, один з хромосомних наборів яких походить від самців з природної популяції *D.*

Таблиця 3
Частота рекомбінацій на ділянці між генами *white* і *cut* в природній популяції *D. melanogaster* м. Одеси у 2009 р.

Місяці збору комах	Кількість особин F ₂				Частота кросингверу	Частота кросингверу в контролі	χ^2
	некросоверних		кросоверних				
	++	<i>wct</i>	<i>w+</i>	<i>+ct</i>	%		
Червень	708	604	145	158	18,76	19,69	0,05
Липень	879	824	176	235	19,44	19,69	0,01
Серпень	319	320	68	62	16,91	19,69	0,37

melanogaster м. Одеси, а інший — від самок з лабораторної лінії *w^{ct}*, не було виявлено статистично достовірних відмін цього показника у мух, зібраних в різні літні місяці (табл. 3).

Стабільність частоти кросинговеру на певній ділянці Х-хромосоми впродовж досліджуваних трьох місяців може свідчити про відсутність мутаційних подій (делеції, інсерції, інверсії, дуплікації), які істотно впливають на гомологію окремих ділянок хромосом в геномах представників природної популяції *D. melanogaster* м. Одеси, оскільки ще Стертевант [9] показав, що хромосомні перебудови призводять до зниження частоти рекомбінацій на ділянках хромосом, в яких вони відбуваються.

Таким чином, всі досліджені протягом червня, липня та серпня 2009 р. частоти алелів β -карбоксиестерази, а також частоти зчеплених зі статтю летальних мутацій та рекомбінаційних подій в Х-хромосомі у представників природних популяцій *D. melanogaster* м. Одеси не виявляли змін під час літнього сезону. Це може свідчити як про відсутність впливу зовнішніх чинників, що могли б призвести до змін в динаміці досліджуваних процесів [10, 11], так і про відсутність активності внутрішньогеномних факторів (мобільних елементів геному), переміщення яких, як відомо [12, 13], викликає підвищення частоти мутацій. Однак в літературі існують дані про відмінність цих параметрів на початку, в середині та в кінці сезону активності мух [8]. Отриманий нами результат може бути пов'язаний з тим, що на широті розташування м. Одеси «вхід» в сезон у популяції *D. melanogaster* відбувається раніше червня, а «вихід» — пізніше серпня. Підтвердження цього припущення потребує подальших досліджень.

Слід також наголосити, що нами досліджувались різні генетичні процеси, реалізації яких прямо не пов'язані між собою. У зв'язку з цим можна було очікувати зміни одного параметра при незмінності інших і навпаки. Натомість усі досліджені показники протягом періоду дослідження залишались незмінними. Цей факт може свідчити про генетичну стабільність популяції дрозофіли м. Одеси і те, що ця популяція за досліджуваними параметрами наближається до ідеальної.

Висновки. В одеській популяції *D. melanogaster* частота алеля β -*Est-6^S* значно перевищувала частоту β -*Est-6^F*, і співвідношення алелів не змінювалось протягом трьох літніх місяців 2009 р. Частота рекомбінаційних подій в Х-хромосомах *D. melanogaster* одеської популяції залишалась сталою протягом сезону досліджень та відповідала теоретично очікуваній частоті. Частоти зчеплених з Х-хромосомою летальних мутацій в *D. melanogaster* із природних популяцій м. Одеси не змінювались впродовж усього періоду проведення досліджень.

*D.B. Radionov, O.V. Prosenko,
A.M. Andrievsky, V.N. Totsky,
V.A. Kucherov, I.A. Kozeretka*

STABILITY OF GENETIC PARAMETERS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* POPULATIONS FROM ODESA

The dynamics of allele frequency of the carboxiesterase gene, the frequency of sex-linked lethal mutations, and recombination events in natural populations of *Drosophila melanogaster* from Odesa were studied. All studied estimates were shown to remain unchanged in June, July, and August during the 2009 collection season.

*Д.Б. Радионов, А.В. Проценко,
А.М. Андрієвський, В.Н. Тоцький,
В.А. Кучеров, І.А. Козерецька*

СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ В ПОПУЛЯЦИИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* г. ОДЕССЫ

Изучены частоты аллелей гена карбоксиэстеразы, а также сцепленных с полом летальных мутаций и рекомбинационных событий у представительей природной популяции *Drosophila melanogaster* г. Одессы. Продемонстрировано, что все исследованные показатели не изменялись у мух из популяций, собранных в июне и августе 2009 г.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Захаров И.К., Ваулин О.В., Илинский Ю.Ю. и др. Источники генетической изменчивости в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Вестн. ВОГиС — 2008. — 12, № 1/2. — С. 112–126.
2. Глазко В.И., Созинов И.А. Генетика изоферментов животных и растений. — Киев : Урожай, 1993. — 528 с.
3. Атраментова Л., Утевська О. Статистичні методи в біології. — Харків, 2007. — 288 с.
4. Bubily O.A., Kalabushkin B.A., Imasheva A.G. Geographic variation of six allozyme loci in *Drosophila melanogaster*.

- an analysis of data from different continents // *Hereditas*. – 1999. – № 130. – P. 25–32.
5. White M.M., Mane S.D., Richmond R.C. Studies of Esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. 18. Biochemical differences between the slow and fast allozymes // *Mol. Biol. Evol.* – 1988. – № 5. – P. 41–62.
 6. Franklin I.R. An analysis of temporal variation at isozyme loci in *Drosophila melanogaster*// *Genetic studies of Drosophila populations*. – Canberra : Austral. Nat. Univ. Press, 1981. – P. 217–236.
 7. Гершензон С.М. Аналитический обзор исследований по популяционной генетике, проведенных в Национальной академии наук Украины. – Киев, 1996. – 72 с.
 8. Берг Р.Л., Бриссинден Э.Б., Александрійська В.Т., Галковская К.Ф. Генетический анализ двух природных популяций *Drosophila melanogaster* // *Журн. общ. биологии*. – 1941. – 2, № 1. – С. 143–158.
 9. Sturtevant A.H. A crossover reducer in *Drosophila melanogaster* due to an inversion of a section of a third chromosome // *Biol. Zentr.* – 1926. – 46. – P. 697–702.
 10. Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. – М.: Наука, 1985. – 400 с.
 11. Ратнер В.А., Васильева Л.А. Мобильные генетические элементы (МГЭ) и эволюция геномов // *Современные проблемы теории эволюции* / Под ред. Л.П. Татаринова. – М.: Наука, 1993. – С. 43–59.
 12. Ashburner M., Golic K., Hawley S. *Drosophila* a laboratory handbook. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. – P. 1075–1123.
 13. Kazazian H.H. Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution // *Science*. – 2004. – 303. – P. 1626–1632.

Надійшла 28.09.10