

ГОРЕНСЬКА О. В.[✉], НАВРОЦЬКА В. В., ВОЛКОВА Н. Є., ФІЛПОНЕНКО Н. С.

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,

Україна, 61022, Харків, м. Свободи, 4, e-mail: olgavg2014@gmail.com, valeriya.navrotskaya@ukr.net, volkovanatalia90@gmail.com, filiponenkon@gmail.com

[✉] olgavg2014@gmail.com, (096) 971-83-99

ЕФЕКТИ ІНБРИДИНГУ В КОНГЕННИХ ЛІНІЯХ ДРОЗОФІЛИ: ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ГЕНЕТИЧНОГО ФОНУ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Мета. Порівняння репродуктивних показників та стрес-стійкості дрозофіли за аутбредного та інбредного розведення. **Методи.** Використано лінії *Drosophila melanogaster* із неповним розвитком радіальної жилки крила – radius incompletus: лабораторну та лінію, у якій мутація переведена на генетичний фон лінії дикого типу, що походить із природної популяції з радіаційно забрудненої території. Лінії пройшли 65 поколінь інбридингу. Аналізували життєздатність (кількість нащадків і відсоток загинувших лялечок), частоту домінуючих летальних мутацій, тривалість життя імаго за голодування.

Результати. Після інбридингу відзначено зниження частоти домінуючих летальних мутацій і збільшення плодючості лінії, яка походить з природної популяції, та зниження відсотка особин, які гинуть на стадії лялечки (в обох лініях). Зниження тривалості життя імаго за голодування було показовим лише для інбредної лінії, яка походить із природної популяції. **Висновки.** Інбридинг упродовж 65 поколінь не викликав негативних наслідків стосовно репродуктивних показників; зниження стрес-стійкості за інбридингом було показано лише для лінії, яка походить із природної популяції з радіаційно забрудненої території.

Ключові слова: дрозофіла, життєздатність, домінуючі летальні мутації, тривалість життя імаго за голодування, інбридинг.

Інбредне розведення організмів у багатьох випадках супроводжується інбредною депресією – зниженням рівня пристосованості, появою аномалій розвитку, мутантних фенотипів, летальних у ранньому онтогенезі; високий ступінь інбридингу призводить до зниження плодючості, виживаності та швидкості розвитку особин. Механізм зниження пристосованості за інбредної депресії пов'язаний із підвищенням рівня гомозиготності за алелями, які негативно впливають на життєздатність, та, меншою мірою, з

підвищенням гомозиготизації у тих локусах, які у гетерозиготному стані зумовлюють зростання виживаності (шляхом «наддомінування») [1; 2]. Прискоренню інбредної депресії сприяють епістатичні взаємодії між генами, які негативно впливають на життєздатність [3], а також стресові умови: інбредні особини характеризуються зниженою здатністю адаптуватися до стресу шляхом регуляції генної активності (у порівнянні з організмами з вищим ступенем гетерозиготності) [4]. Між тим, у літературі описано багато прикладів того, коли інбридинг не призводив до негативних наслідків [5].

Природні популяції *Drosophila melanogaster* насичені алелями генів, які негативно впливають на життєздатність [6], у тому числі летальними – майже 30 % самців, отриманих із природних популяцій, мають леталі у хромосомах 2 або 3 (Х-асоційовані леталі швидко зникають із популяцій) [1]. За даними [2], рівень інбредної депресії у популяції дрозофіли, яка походить із природної, оцінюваний за виживанням під час розвитку від яйця до лялечки, визначався на 40 % наявністю рецесивних леталей і на 60 % – присутністю нелетальних алелів генів із негативним впливом на життєздатність.

На пристосованість організмів і мутаційні процеси в природних популяціях впливають фактори зовнішнього середовища, які постійно змінюються, інколи дуже суттєво (наприклад, внаслідок техногенних катастроф, зокрема таких, як аварія на ЧАЕС). У 2005–2007 рр. І. А. Козерецькою були отримані лінії дрозофіли з природних популяцій із радіаційно забруднених територій; у ряді робіт генетиків Київського та Харківського університетів проаналізовано мутаційний рівень та прояв адаптивно важливих ознак у цих лініях. Так, встановлено, що у популяціях Чорнобильського регіону спостерігається найвищий, у порівнянні з іншими популяціями України, рівень видимих мутацій (фенотипових порушень) [7]. «Чорнобильські мухи»

© ГОРЕНСЬКА О. В., НАВРОЦЬКА В. В., ВОЛКОВА Н. Є., ФІЛПОНЕНКО Н. С.

характеризуються частотою леталей на невисокому (контрольному) рівні, але у процесі переходу до культивування таких популяцій відбувається підвищення цього показника, що вказує на їх високу гетерозиготність. Загалом у популяції із радіаційно забруднених територій існує зворотна залежність частоти леталей від щільності радіаційного забруднення, що можна пояснити як жорстким доббором, який відбувається на таких територіях, так і адаптацією організмів до хронічного впливу радіації [8].

Щодо ознак пристосованості, то у різних лініях, започаткованих від особин із природних популяцій із радіаційно забруднених територій, за їх культивування спостерігають такі зміни, як, наприклад, значне підвищення тривалості життя, плодючості чи локомоторної активності, що, вочевидь, забезпечує їх виживання [9; 10; 11].

У наших попередніх роботах досліджено показники пристосованості ліній дрозофіли, які походять із популяцій Чорнобильського регіону, за дії стресових факторів різної природи. Одним із таких факторів є інбредне розведення особин.

Метою роботи було порівняння репродуктивних показників та стійкості імаго дрозофіли до голодування за аутбредного та інбредного розведення. У роботі представлено результати оцінки ряду адаптивно важливих ознак ліній дрозофіли за досягнення ними ступеня інбридингу 65 поколінь.

Матеріали і методи

Робота проведена на лініях *Drosophila melanogaster* із неповним розвитком радіальної жилки крила – *radius incompletus* (*ri*), який зумовлений мутацією в гені *knirps*. Мутація була переведена на генетичний фон лінії дикого типу Озеро 2, яка походить із природної популяції з радіаційно забрудненої території (берег водойми-охолоджувача ЧАЕС); лінія позначена *ri(Oz)*. Для аутбредної лінії Озеро 2 характерний високий рівень частоти домінантних летальних мутацій [9]. До моменту початку досліджень лінії пройшли 65 поколінь інбридингу. Лінії взяті з колекції кафедри генетики і цитології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, яка становить Національне надбання України.

Для оцінки рівня життєздатності ліній аналізували плодючість за кількістю особин на стадії лялечки, кількість загиблих лялечок, частоту домінантних летальних мутацій і тривалість життя імаго за голодування. Облік частоти

домінантних летальних мутацій (ДЛМ) проводився за стандартною методикою [12], у кожній лінії аналізували кладки яєць, отриманих не менш ніж від 120 самок. Тривалість життя імаго за голодування визначали, утримуючи віргінних особин (по 10–15 особин) у пробірках без корму, але з доступом до води: окремо самців і самок; облік кількості особин, що вижили, проводили через кожні 3 години до повної загибелі особин у кожній пробірці. Розраховували середнє значення тривалості життя під час голодування (у годинах). Було проаналізовано по 90–100 особин кожної статі у всіх лініях. Плодючість визначали за кількістю нащадків, отриманих від однієї батьківської пари. Для цього підраховували кількість пупаріїв у пробірках. При цьому також оцінювали загибель на стадії лялечки – за відсотком пупаріїв, з яких не вийшли імаго, від загальної кількості пупаріїв. Отримані показники аналізували у 10–15 повторностях.

Для кожного показника плодючості розраховували середнє арифметичне значення і похибку середнього. Перевірку розподілу даних проводили, використовуючи критерій Шапіро-Уїлка. Оскільки розподіл відповідав нормальному закону, для порівняння груп використовували параметричний метод, значущість відмінностей оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Значення показника загибелі особин на стадії лялечки представлені у вигляді часток зі статистичними похибками; статистичну значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою *F*-критерію [13]. У роботі прийнятий рівень значущості $p < 0,05$.

Результати та обговорення

За аутбредного розведення лінії *ri* та *ri(Oz)* не відрізнялися значуще за загальною кількістю нащадків на стадії лялечки, але кількість загиблих особин під час метаморфозу була дещо вищою у вихідній лабораторній лінії *ri*. Після інбридингу впродовж 65 поколінь між лініями з'являються відмінності за кількістю нащадків: відзначено збільшення плодючості лінії *ri(Oz)*. Інбридинг супроводжувався суттєвим зниженням відсотка особин, які гинуть на стадії лялечки (рис. 1). Відмінності за цим показником між лініями відсутні.

Вихідний рівень частоти ДЛМ (до початку інбридингу) суттєво відрізнявся у досліджених лініях: лінія *ri(Oz)* характеризувалася значно вищим рівнем ембріональної загибелі у порівнянні з лінією *ri*, що можна пояснити високою

частотою ДЛМ у лінії Озеро 2, яка була використана для заміщення генетичного фону [9]. В умовах інбредного розведення знижується кількість раних і пізніх ДЛМ у лінії *ri(Oz)* (рис. 2). Очевидно, саме цим зниженням кількості особин, які загинули на раних ембріональних етапах онтогенезу, можна пояснити збільшення кількості нащадків на стадії лялечки (рис. 1). У лінії *ri* зміни сумарної частоти ДЛМ за інбридингу не відзначено, хоча відбулося зменшення частоти раних та підвищення частоти пізніх ДЛМ.

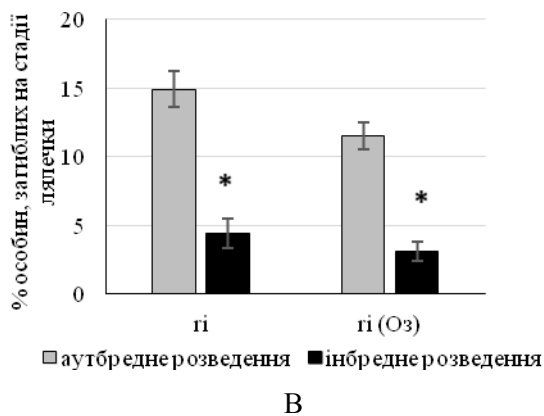
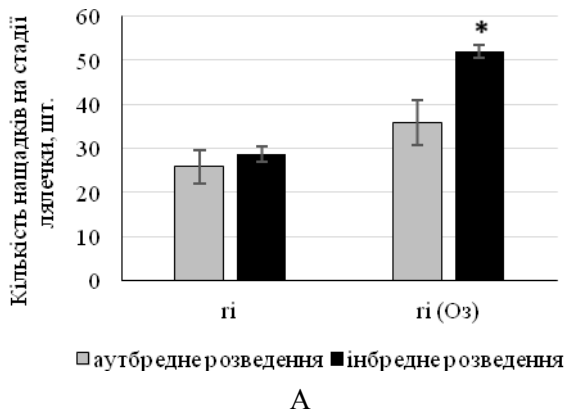


Рис. 1. Показники плодючості імаго ліній дрозофіли з мутацією *ri* залежно від генетичного фону: А – кількість нащадків на стадії лялечки; В – % загинувших лялечок. * – відмінності, значущі у порівнянні із значенням показника, за аутбредного розведення лінії.

Аналіз стійкості імаго до голодування (рис. 3) показав відсутність змін цього показни-

ка самок і самців лінії *ri* у зв'язку з інбридингом. Водночас самці інбредної лінії *ri(Oz)* мають дещо знижену тривалість життя за голодування (у порівнянні із значенням цього показника за аутбредного розведення лінії). Загалом стійкість імаго до голодування виявилася найбільш стабільним показником у цьому дослідженні – для нього відзначені найменші зміни за інбридингу і відсутність міжлінійних відмінностей за аутбредного розведення ліній.

Відомо, що інбредна депресія може бути слабо виражена у сприятливих умовах та значно інтенсифікується в умовах стресу, що свідчить про зниження здатності інбредів до виживання в умовах, що змінюються [4]; у нашій роботі зниження стрес-стійкості було показано лише для інбредної лінії *ri(Oz)*.

На цьому етапі дослідження виявлено більшу стійкість лабораторної лінії дрозофіли до впливу інбридингу; для неї характерний менший діапазон змін ознак життєздатності. Можливо, подальший інбридинг продемонструє ще більші відмінності між лініями, генотип яких формувався за впливу підвищеного радіаційного фону, та лабораторними лініями.

Висновки

Інбридинг упродовж 65 поколінь не викликав негативних наслідків стосовно пристосованості, за показниками плодючості і загибелі за метаморфозу. Навпаки – показано зниження загибелі лялечок у лініях під час їх інбредного розведення. Підвищення частоти ДЛМ за інбридингу також не спостерігалось. Для лінії, яка була започаткована з природної популяції з радіаційно забрудненої території і характеризується високою частотою мутацій, показано суттєве зниження частоти ДЛМ (і раних, і пізніх) на момент досягнення ступеня інбридингу 65 поколінь. Таким чином, можна говорити про позитивний ефект інбридингу у окресленому випадку – добір проти гомозигот за алелями, що негативно впливають на життєздатність. Зниження стрес-стійкості за інбридингу було показано лише для лінії, яка походить із природної популяції з радіаційно забрудненої території. Виявлено більшу стійкість лабораторної лінії дрозофіли до впливу інбридингу.

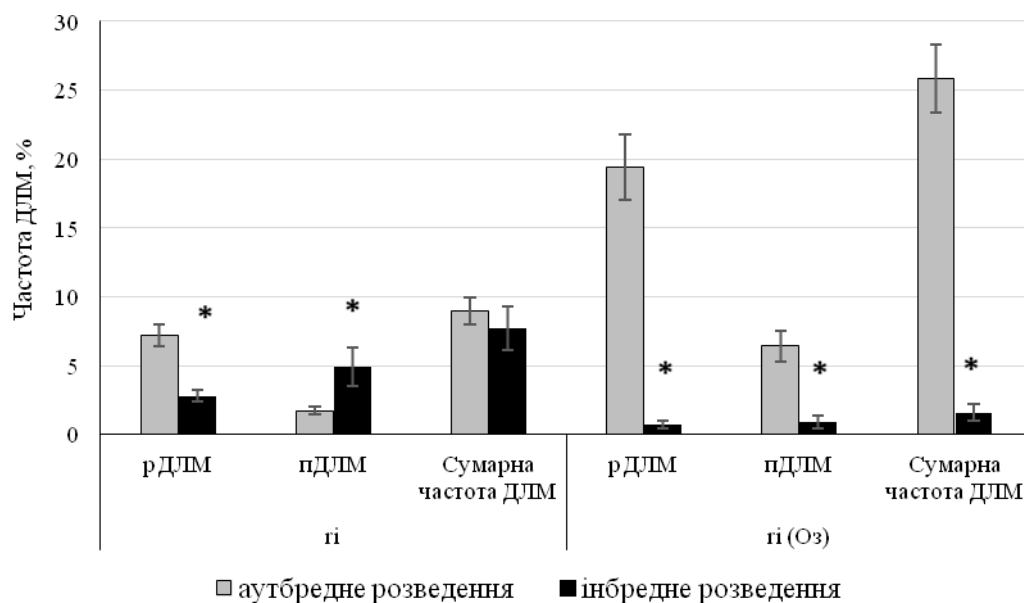


Рис. 2. Частота доміантних летальних мутацій у ліній дрозофіли з мутацією *ri* залежно від генетичного фону. рДЛМ – ранні доміантні летальні мутації; пДЛМ – пізні доміантні летальні мутації. * – відмінності, значущі у порівнянні із значенням показника, за аутбредного розведення лінії.

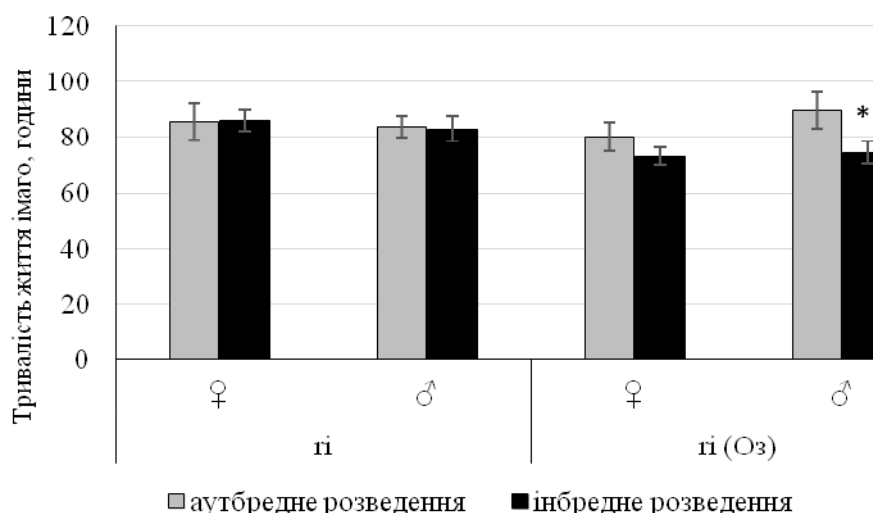


Рис. 3. Середні значення тривалості життя імаго ліній дрозофіли з мутацією *ri* залежно від генетичного фону (за голодування). * – відмінності, значущі у порівнянні із значенням показника, за аутбредного розведення лінії.

References

- Charlesworth D., Willis J. The genetics of inbreeding depression. *Nat Rev Genet.* 2009. Vol. 10. P. 783–796. <https://doi.org/10.1038/nrg2664>.
- Bersabé D., García-Dorado A. On the genetic parameter determining the efficiency of purging: an estimate for *Drosophila* egg-to-pupae viability. *Journal of evolutionary biology.* 2013. Vol. 26 (2). P. 375–385. <https://doi.org/10.1111/jeb.12054>.
- Domínguez-García S., García C., Quesada H., Caballero A. Accelerated inbreeding depression suggests synergistic epistasis for deleterious mutations in *Drosophila melanogaster*. *Heredity.* 2019. Vol. 123 (6). P. 709–722. <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0263-6>.
- Schou M.F., Bechsgaard J., Muñoz J., Kristensen T.N. Genome-wide regulatory deterioration impedes adaptive responses to stress in inbred populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution.* 2018. Vol. 72 (8). P. 1614–1628. <https://doi.org/10.1111/evo.13497>.

5. Shinkarenko L.N., Guliakova O.G., Malienko V.A., Melnychuk S.D., Spyrudonov V.G. Analysis of gene variability in the dogs (American Pit Bull Terrier breed) with high inbreeding level using microsatellite markers. *Tsitologiya i Genetika*. 2010. No. 4. P. 16–22. [in Russian]
6. Haag-Liautard C., Dorris M., Maside X., Macaskill S., Halligan D.L., Houle D., Charlesworth B., Keightley P.D. Direct estimation of per nucleotide and genomic deleterious mutation rates in *Drosophila*. *Nature*. 2007. Vol. 445 (7123). P. 82–85. <https://doi.org/10.1038/nature05388>.
7. Kharchenko O.O., Serga S.V., Prochenko O.V., Tretyak A.P., Kozeretska I.A. Mutation processes in the natural population of *Drosophila melanogaster* from radiation contaminated territories. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*. 2013. Vol. 12. P. 169–172. [in Ukrainian]
8. Kozeretska I.A., Protsenko A.V., Rushkovskyy S.R., Afanasieva K.S., Chuba A.I., Bezrukov V.F., Mousseau T.A., Moller A.P. Mutation processes in the natural populations of *Drosophila* and *Hirundo rustica* from Ukrainian radiation contaminated territories. *Tsitologiya i Genetika*. 2008. No. 4. P. 63–68. [in Russian]
9. Filiponko N.S., Volkova N.Ye., Kostenko V.V., Glianko Ye.A., Vorobyeva L.I. The study of adaptability components in *Drosophila melanogaster* stocks obtained from natural populations from the territories with different level of radioactive contamination. *Drosophila in the experimental genetics and biology : Collected papers*. Kharkiv: KhNU. 2008. P. 98–101. [in Russian]
10. Filiponko N.S., Volkova N.Ye., Vorobyeva L.I. Analysis of life span of imago of *Drosophila melanogaster* stocks obtained from natural populations from the territories with different levels of radioactive contamination. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*. 2009. Vol. 6. P. 319–322. [in Russian]
11. Grigoriev D.S., Vorobyova L.I. Locomotor activity in *Drosophila melanogaster* stocks obtained from populations of different geographical origin. *The Journal of V. N. Karazin National University. Series "Biology"*. 2010. Vol. 11, no. 905. P. 77–83. [in Russian]
12. Tikhomirova M.M. Genetic analysis. Leningrad: Leningrad State University, 1990. 280 p.
13. Atramentova L.A., Utyevska A.M. Statistical methods in biology : Textbook. Kharkiv: KhNU, 2007. 288 p.

GORENSKAYA O.V., NAVROTSKAYA V.V., VOLKOVA N.Ye., FILIPONENKO N.S.

V.N. Karazin Kharkiv National University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 4, e-mail: olgavg2014@gmail.com, valeriya.navrotskaya@ukr.net, volkovanatalia90@gmail.com, filiponenkon@gmail.com

INBREEDING EFFECTS IN *DROSOPHILA* CONGENIC STRAINS: THE INFLUENCE OF GENETIC BACKGROUND OF DIFFERENT ORIGIN

Aim. To compare reproductive indices and stress resistance of *Drosophila* at outbreeding and inbreeding. **Methods.** *Drosophila melanogaster* congenic strains with incomplete development of the radial wing vein – *radius incompletus* – were used: the laboratory one and the strain, in which the mutation was placed into the genetic background of wild type strain, which originates from the natural population from radiation contaminated territory. Before the experiment strains have passed 65 generations of inbreeding. Viability (number of individuals, pupa stage mortality), dominant lethal mutations frequency and life span of imago at starvation were analysed. **Results.** After inbreeding, there was a decrease in the frequency of dominant lethal mutations and an increase in viability of the strain, which originates from the natural population, and a decrease of mortality at the pupal stage in both strains. Decreased life span of imago at starvation has been shown only for the inbred strain, which originates from the natural population. **Conclusions.** Inbreeding for 65 generations has no significant negative effect on reproductive indices; reduction of stress resistance during inbreeding has been shown only for the strain, which originates from the radiation contaminated territory.

Keywords: *Drosophila*, viability, dominant lethal mutations, life span of imago at starvation, inbreeding.