

ГОРОДНЯНСКИЙ И. Д.

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина,  
Украина, 61022, г. Харьков, площадь Свободы, 4.  
e-mail: alataron@gmail.com, (050) 872-94-87, (057) 707-52-71

**ПРОЯВЛЕНИЕ ГИБРИДНОГО ДИСГЕНЕЗА *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ЛИНИИ *HARWICH* ПРИ ПОДАВЛЕНИИ ВНУТРЕННЕЙ МИКРОФЛОРЫ ТЕТРАЦИКЛИНОМ**

**Цель.** Оценить динамику проявления гибридного дисгенеза в линии *Harwich*, наблюдаемого под воздействием тетрациклина, сравнить с результатами линии *Oregon-R*. **Методы.** Исследовали линию *Drosophila melanogaster Harwich*. Данная линия считается стандартной линией *P* цитотипа. Удаление вольбахии из организма осуществляли с помощью антибиотика тетрациклина. Уровень гибридного дисгенеза исследовали методом извлечения гонад мух и оценки их состояния. **Результаты.** Зафиксировано стабильное и значимое повышение доли дисгенных особей внутри линии *Harwich* после подавления внутренней микрофлоры (в том числе *Wolbachia pipientis*) тетрациклином. **Выводы.** Подавление внутренней микрофлоры *Drosophila melanogaster* тетрациклином значимо влияет на уровень проявления гибридного дисгенеза, вызванного транспозициями *P*-элемента. Полученные данные сходны с результатами аналогичного исследования уровня проявления гибридного дисгенеза, вызванного транспозициями МГЭ *hobo*.

**Ключевые слова:** мобильные генетические элементы, гибридный дисгенез, *P*-элемент, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia pipientis*.

Мобильные генетические элементы (МГЭ) являются важным компонентом генома эукариот. На данный момент подтверждена роль МГЭ как компонентов различных систем внутригеномной регуляции и внутривидовых источников генетической изменчивости [1, 2]. Однако все еще крайне мало изучена взаимосвязь транспозиций мобильных элементов генома с действием других внутриорганизменных факторов, также влияющих на жизнеспособность и приспособленность особей и популяций *Drosophila melanogaster*. Одним из наиболее значимых среди подобных факторов

считается действие паразитической бактерии *Wolbachia pipientis* [3, 4].

Гибридный дисгенез – комплекс генетических аномалий, возникающих вследствие транспозиций МГЭ в половых клетках, в частности таких, как хромосомные аберрации, нерасхождение хромосом, существенное повышение частоты некоторых мутаций и (для определенных МГЭ дрозофилы) *P* и *hobo*, полная или частичная редукция гонад дисгенных особей [5–7]. Значимый уровень проявления гибридного дисгенеза (в т.ч. значительное количество особей с редуцированными гонадами) можно наблюдать в потомстве от так называемых дисгенных скрещиваний [6, 7], однако незначительная доля дисгенных особей постоянно присутствует в чистых линиях дрозофилы. Схемы проявления гибридного дисгенеза для МГЭ *P* и *hobo* в целом схожи, однако существует важное отличие: для проявления гибридного дисгенеза, вызываемого элементом *P*, критически важно направление скрещивания. Для *hobo* элемента гибридный дисгенез может наблюдаться в потомстве любого скрещивания особей разных цитотипов, а иногда и двух особей *H* цитотипа [5].

Результаты эксперимента с линией *Oregon-R* [8] продемонстрировали специфическую динамику изменения доли особей с полной и частичной редукцией гонад внутри линии при добавлении в питательную среду тетрациклина. В геноме данной линии присутствуют полноразмерные копии МГЭ *hobo*, однако активности МГЭ *P* по литературным и экспериментальным данным внутри линии не наблюдается. Исследуемая линия *Harwich*, напротив, является одной из немногих известных линий цитотипа *P*, *E* [9]. Таким образом, анализируя результаты экспериментов с данными линиями, возможно сравнить динамику изменения доли особей с полной и частичной редукцией гонад

внутри линии при добавлении в питательную среду тетрациклина, являющуюся результатом транспозиций каждого из этих элементов.

Целью данной работы было оценить изменения частоты гибридного дисгенеза в линии *Harwich*, наблюдаемые под воздействием тетрациклина, провести сравнение полученных результатов с данными проведенного ранее аналогичного исследования линии *Oregon-R*.

### Материалы и методы

В исследовании использовали линию *Drosophila melanogaster Harwich*. В геноме линии имеются высокоактивные полноразмерные копии *P*-элемента. Данная линия считается стандартной линией *P* цитотипа в Р-М системе гибридного дисгенеза. Линия инфицирована *Wolbachia pipientis*, что подтверждено при помощи окрашивания клеток гонад мух по Грамму. Содержали линию на стандартной дрожжевой среде при температуре 23<sup>0</sup>С. Для наркотизации применялся диэтиловый эфир.

Удаление вольбахии из организма проводили путем содержания мух на среде с добавлением антибиотика тетрациклина в концентрации 0,25 мг на 1 мл среды [3, 10]. Согласно литературным данным, исчезновение вольбахии происходит в пятом из поколений, подвергавшихся воздействию тетрациклина. Для полной уверенности в гибели вольбахии не пятое, а седьмое поколение было пересажено на нормальную среду для восстановления внутренней микрофлоры организма. В исследовании использовали пятое из поколений, полученных после пересадки на нормальную среду. Всего произвели оценку состояния гонад в четырех выборках: контрольной линии; пятом из поколений, полученных после пересадки линии на нормальную среду; потомства от скрещиваний самок пятого из поколений, полученных после пересадки линии на нормальную среду, с самцами контрольной линии и от скрещиваний самок контрольной линии с самцами пятого из поколений, полученных после пересадки линии на нормальную среду. Всего были исследованы гонады 3850 особей *D. melanogaster*.

Потомство от скрещиваний разделяли по полу в течение суток после выхода из пупариев на протяжении всего периода вылета имаго. Сточные выборки самцов и самок содержали раздельно на свежей среде до полного развития

гонад (трехдневный период), чтобы минимизировать возможную погрешность эксперимента. По истечении трех дней с момента отсадки производили извлечение гонад и оценку их состояния. Состояние гонад оценивали по четырехбалльной шкале: 1 – обе гонады нормально развиты; 2 – одна или обе гонады немного меньше нормального размера (считали близким к норме); 3 – недоразвита или полностью редуцирована одна из гонад; 4 – редукция обеих гонад.

Статистический анализ выполнен с использованием непараметрического дисперсионного анализа с критерием *H* Краскела – Уоллиса. Расчеты произведены с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007-2016 и STATISTICA 8.0.

### Результаты и обсуждение

Полученные результаты представлены в табл. и на рис. 1 и 2. Как для самцов, так и для самок после пересадки на содержащую тетрациклин среду наблюдается значительное увеличение доли особей с признаками гибридного дисгенеза. Значительное количество особей с односторонней и полной редукцией гонад присутствует в каждом из исследованных поколений линии. Уровень гибридного дисгенеза незначительно снижается после пересадки линии на нормальную среду и частичного восстановления внутренней микрофлоры, однако он все еще значительно (и значимо) выше по сравнению с контролем.

Полученные результаты сходны с данными предыдущего эксперимента с линией *Oregon-R* [8], однако процент дисгенных особей внутри линии *Harwich* оказался в среднем несколько выше, чем для *Oregon-R*. На данный момент нельзя с точностью утверждать, чем вызвано это отличие. Теоретически оно может являться результатом возможно большей интегрированности *P* элемента в какие-либо из внутригеномных регуляторных механизмов дрозофилы либо являться следствием меньшей стабильности цитотипов *hobo* элемента по сравнению с *P* и, как следствие, возможно большей приспособленностью генома хозяина к транспозициям данного МГЭ. Однако оно вполне может быть связано с колебаниями активности мобильных элементов генома в ряду поколений или особенностями самой линии, не связанными с МГЭ.

Таблица. Доля особей (%) с разной степенью редукции гонад в потомстве экспериментальных скрещиваний и контрольных линий

Скрещивания	Пол	Количество исследованных особей (n)	1, 2	3	4
Контроль	♀	465	90,1	5,60	4,30
	♂	474	92,63	3,79	3,58
Tetr 1	♀	348	79,32	14,08	6,60
	♂	291	78,69	11,34	9,97
Tetr5	♀	369	78,60	13,82	7,58
	♂	340	78,82	10,59	10,59
Tetr7	♀	380	78,97	13,42	7,61
	♂	365	80,09	9,90	10,01
Norm 5	♀	419	85,45	8,35	6,20
	♂	399	82,73	8,50	8,77

Примечания: Tetr 1, 5, 7 – первое, пятое и седьмое поколения, выращенные на содержащей тетрациклин среде, Norm 5 – пятое поколение после пересадки поколения Tetr 7 на нормальную среду, 1, 2 – нормальное и близкое к норме состояние гонад, 3 – односторонняя редукция гонад, 4 – полная редукция гонад.

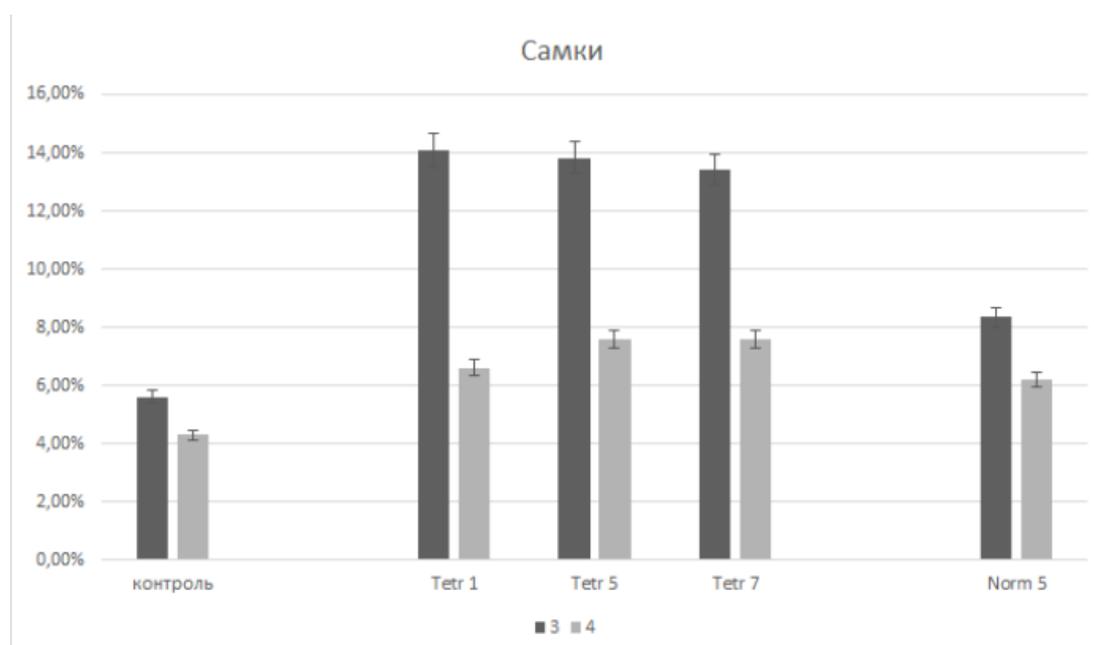


Рис. 1. Результаты исследования среди самок исследуемой линии. 3 и 4 – частичная и полная редукция гонад соответственно.

Особый интерес представляет различное соотношение долей особей с односторонней и полной редукцией гонад среди самцов и самок исследуемой линии, поскольку данное различие практически идентично наблюдавшемуся в линии *Oregon R*. Если среди самок процент особей с частично редуцированными гонадами был

значительно выше, чем с полной, в любом из экспериментальных скрещиваний, то среди самцов наблюдаемое количество таких особей было практически равным в поколениях Tetr 5 и Tetr 7, а в полученном после пересадки на нормальную среду Norm 5 разница была крайне мала.

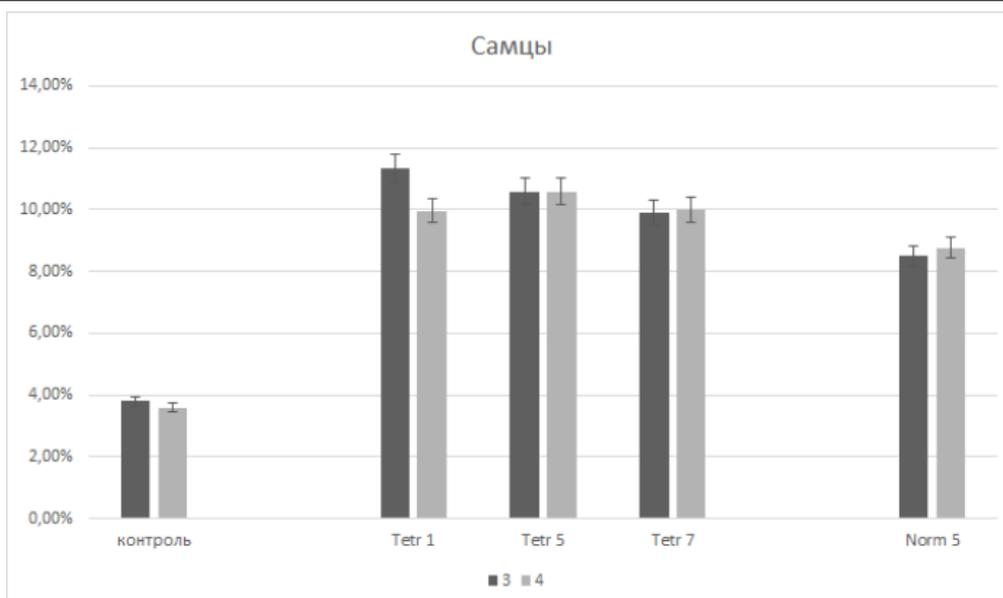


Рис. 2. Результаты исследования среди самцов исследуемой линии. 3 и 4 – частичная и полная редукция гонад соответственно. Различия экспериментальных выборок с контрольной значимы на уровне  $p < 0,05$ .

### Выводы

Подавление внутренней микрофлоры *Drosophila melanogaster* тетрациклином значительно влияет на уровень проявления гибридного дисгенеза, вызванного транспозициями *P*-элемента.

Полученные данные сходны с результатами аналогичного исследования уровня проявления гибридного дисгенеза, вызванного транспозициями МГЭ *hobo*.

### References

- Vasil'eva L.A., Antonenko O.V., Zakharov I.K. The role of mobile genetic elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2011. Vol. 15, № 2. P. 225–260. [in Russian] / Васильева Л.А., Антоненко О.В., Захаров И.К. Роль мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011. Т. 15, № 2. С. 225–260.
- Pimpinelli S., Berloco M., Fanti L., Dimitri P., Bonaccorsi S., Marchetti E., Caizzi R., Caggese C., Gatti M. Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1995. Vol. 92. P. 3804–3808.
- Fry A.J., Palmer M.R., Rand D.M. Variable fitness effects of Wolbachia infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*. 2004. P. 1–11.
- Weeks A.R., Turelli M., Harcombe W.R., Reynolds K.T., Hoffmann A.A. From parasite to mutualist: rapid evolution of Wolbachia in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology*. 2007. Vol. 5, Is. 7. P. 997–1005.
- Yurchenko N.N., Kovalenko L.V., Zakharov I.K. Transposable elements: instability of genes and genomes. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2011. Vol. 15, № 2. P. 261–270. [in Russian] / Юрченко Н.Н., Коваленко Л.В., Захаров И.К. Мобильные генетические элементы: нестабильность генов и геномов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011. Т. 15, № 2. С. 261–270.
- Kozeretska I.A. *Drosophila melanogaster* transposable elements: distribution in natural populations. *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetiki i selekcioneriv*. 2010. Vol. 8, № 1. P. 81–90. [in Russian] / Козерецкая И.А. Мобильные генетические элементы *Drosophila melanogaster*: популяционно-генетический аспект. *Вестник Украинского общества генетиков и селекционеров*. 2010. Т. 8, № 1. С. 81–90.
- Kravets A.P., Mousseau T.A., Omel'chenko Zh.A., Vengjen G.S. Dynamics of hybrid dysgenesis frequency in *Drosophila melanogaster* in controlled terms of protracted radiation exposure. *Cytology and genetics*. 2010. № 1. P. 21–26. [in Russian] / Кравец А.П., Мюссе Т.А., Омельченко Ж.А., Венгжен Г.С. Динамика частоты гонадального дисгенеза у *Drosophila melanogaster* в контролируемых условиях хронического облучения. *Цитология и генетика*. 2010. № 1. С. 21–26.
- Gorodnyanski I.D., Vorobyova L.I. Effect of suppression of internal microflora by tetracycline on the level of manifestation of the hybrid dysgenesis of *Drosophila melanogaster*. *Factors in elemental evolution of organisms*. 2018. Vol. 22. P. 34–39. [in Russian] / Городнянский И.Д., Воробьева Л.И. Влияние подавления внутренней микрофлоры тетрациклином на уровень проявления гибридного дисгенеза *Drosophila melanogaster*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. Т. 22. С. 34–39.
- Kidwell M.G., Kidwell J.F., Sved J.A. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. *Genetics*. 1977. Vol. 86. P. 813–833.

10. Belousov A.O., Kozeretzkaya I.A. Symbiotic bacteria modifying the reproductive processes in *Drosophila melanogaster*. *Microbiology journal*. 2011. Vol. 73, № 2. P. 43–52. [in Russian] / Козерецкая И.А. Симбиотические бактерии, модифицирующие процессы репродукции у *Drosophila melanogaster*. *Мікробіологічний журнал*. 2011. Т. 73, № 2. С. 43–52.

**GORODNYANSKI I.D.**

V.N. Karazin Kharkiv National University,  
Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 4, e-mail: alatarron@gmail.com

**MANIFESTATION OF HYBRID DYSGENESIS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* HARWICH LINE WITH TETRACYCLINE SUPPRESSED INTERNAL MICROFLORA**

**Aim.** To evaluate the dynamics of the manifestation of hybrid dysgenesis in the Harwich line observed under the influence of tetracycline and compare the gathered data with the data for the Oregon-R line. **Methods.** The line of *Drosophila melanogaster* Harwich was investigated. This line is considered the standard line of the *P* cytotype. Removal of *Wolbachia* from the body was implemented using antibiotic tetracycline. The level of hybrid dysgenesis was studied by the method of extracting gonad flies and assessing their condition. **Results.** A stable and significant increase in the proportion of dysgenic individuals within the Harwich line was recorded after suppression of the internal microflora - including *Wolbachia pipientis* – by tetracycline. **Conclusions.** The suppression of the internal microflora of *Drosophila melanogaster* by tetracycline significantly affects the level of manifestation of hybrid dysgenesis caused by transpositions of the *P*-element. The data obtained are similar to the results of a similar study of the level of manifestation of hybrid dysgenesis caused by transpositions of *hobo* MGE.

**Keywords:** mobile genetic elements, hybrid dysgenesis, *P*-element, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia pipientis*.

**ГОРОДНЯНСЬКИЙ І. Д.**

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,  
Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, e-mail: alatarron@gmail.com

**ПРОЯВ ГІБРИДНОГО ДИСГЕНЕЗУ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ЛІНІЇ HARWICH ЗА ПРИГНІЧЕННЯ ВНУТРІШНЬОЇ МІКРОФЛОРИ ТЕТРАЦИКЛІНОМ**

**Мета.** Оцінити частоту прояву гібридного дисгенезу в лінії Harwich, що спостерігається за впливу тетрацикліну, порівняти з результатами лінії Oregon-R. **Методи.** Досліджували лінію *Drosophila melanogaster* Harwich. Надана лінія вважається стандартною лінією *P* цитотипу. Видалення вольбахії з організму здійснювали за допомогою антибіотика тетрацикліну. Рівень гібридного дисгенезу досліджували методом вилучення гонад мух і оцінки їх стану. **Результати.** Зафіксовано стабільне і значуще підвищення частки дисгенних особин в лінії Harwich після пригнічення внутрішньої мікрофлори (в тому числі *Wolbachia pipientis*) тетрацикліном. **Висновки.** Пригнічення внутрішньої мікрофлори *Drosophila melanogaster* тетрацикліном значно впливає на рівень прояву гібридного дисгенезу, викликаного транспозиціями *P*-елемента. Отримані дані відповідають результатам аналогічного дослідження рівня прояву гібридного дисгенезу, викликаного транспозиціями МГЕ *hobo*.

**Ключові слова:** мобільні генетичні елементи, гібридний дисгенез, *P*-елемент, *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia pipientis*.