

ЧАСТОТИ ГЕНОТИПІВ І АЛЕЛІВ ЗА ЛОКУСОМ β -ЕСТЕРАЗИ ЯКІ ТРАПЛЯЮТЬСЯ В ЛАБОРАТОРНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ ОКРЕМИХ ВИДІВ ДРОЗОФІЛ

С. Пастернак, А. Андрієвський

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса 65026, Україна
e-mail: biopaster@gmail.com

Методом диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі з подальшим гістохімічним виявленням ферментних фракцій визначали частоти генотипів і алелів за локусом β -естерази (К.Ф. 3.1.1.1) в лабораторних популяціях *Drosophila virilis* (Sturtevant, 1916), *D. simulans* (Sturtevant, 1919) та *D. mercatorum* (Patterson et Weeler, 1942), створених із природних популяцій Київської та Одеської областей. У *D. virilis* виявлено три алелі β -естерази та два генотипових класи – гетерозиготи і гомозиготи домінуючі. У *D. simulans* виявлено два алелі відповідного ферменту і один генотиповий клас – гетерозиготний. У *D. mercatorum* виявлено три алелі і три генотипових класи, що нерівномірно представлені у популяції. Визначено частоти алелів, які кодують відповідні алелі β -естерази, а також частоти відповідних генотипів. Встановлено відхилення спостережуваних частот генотипів від теоретично очікуваних. Розглядається питання про вплив природного добору, спрямованого проти певних генотипів *D. simulans*. Крім того, досліджено вплив ефекту «пляшкового горла» на частоти алелів і генотипів у досліджуваних лабораторних популяціях.

Ключові слова: β -естераза, алелі, частоти алелів і генотипів, дрозофіла.

Однією з найважливіших характеристик як природних, так і штучно створених популяцій, є їхня генетична гетерогенність. У її основі лежить поліморфізм ряду генів, представлених у популяції кількома алельними варіантами. Інколи ці алелі кодують різні за своєю експресивністю генопродукти, одні з яких більш, а інші – менш ефективно виконують свої функції. У деяких випадках ефективність функції алеля може прямо або опосередковано впливати на життєздатність чи репродуктивний успіх особини; в такому разі на генотип, алелі якого менш ефективно виконують свої функції, діятиме негативний добір. Однак частота алеля може і не залежати від тиску добору і залишатися низькою унаслідок дрейфу генів [1].

Важливим для еволюції популяцій є так званий ефект «пляшкового горла» – скорочення генетичного різноманіття популяції внаслідок проходження періоду, під час якого з тих чи інших причин відбувається критичне зменшення чисельності популяції з подальшим її відновленням. При цьому скорочення генетичного різноманіття призводить до зміни показників частот алелів генів, а відповідно і генотипів. У зв'язку з цим даний ефект розглядається у популяційно-генетичних дослідженнях як один із факторів еволюції [4].

Метою цієї роботи було вивчити генетичну структуру лабораторних популяцій *D. simulans*, *D. virilis* і *D. mercatorum*, поліморфних за локусом β -Est. Для досягнення мети були поставлені такі завдання: визначити частоти алелів локусу β -Est в лабораторних популяціях досліджуваних видів дрозофіл; визначити частоти відповідних генотипів; дослідити вплив ефекту «пляшкового горла» на частоти алелів і генотипів.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження слугували випадково відібрані імаго лабораторних популяцій *D. simulans* (Sturtevant, 1919), *D. virilis* (Sturtevant, 1916) (мухи отримані з колекції кафедри загальної та молекулярної генетики Київського національного університету імені Т. Г. Шевченка) і *D. mercatorum* (Patterson et Weeler, 1942) (мухи виділені з природної Одеської популяції), культивовані в Лабораторії фізико-хімічних методів досліджень ОНУ імені І. І. Мечникова протягом кількох років. У експерименті було використано по 40 особин *D. mercatorum* і *D. virilis* та 80 особин *D. simulans*. Розвиток мух відбувався в умовах постійної температури (+25°C) і цілодобового затемнення на стандартному чотирикомпонентному поживному середовищі [5]. Популяції усіх трьох видів були представлені великою кількістю особин (>> 1000) і перебували в рівновазі.

Поліморфізм за локусом β -естерази вивчали методом лужного електрофорезу в поліакриламідному гелі з подальшим гістохімічним виявленням ферментних фракцій. Для цього окремо взятих імаго гомогенізували в 10 мкл 0,1 М гліцин-*NaOH* буфера, *pH* 9,0, що містить 1% тритона X-100. Гомогенати центрифугували при 10 000 *g* протягом 15 хв на холоді. Далі отримані екстракти змішували з 5 мкл 0,01% бромфенолового синього, приготованого на 60%-ному розчині сахарози, вносили в лунки гелевого блоку і піддавали електрофоретичному розділенню в системі лужного (*pH* 8,3–8,9) вертикально-пластинчастого 7%-ного поліакриламідного гелю. Після електрофоретичного розділення ферменти, що містяться в гелевому блоці, виявляли за допомогою β -нафтилацетату і солі діазонію. І субстрати, і діазоній попередньо розчиняли у 200 мкл диметилформаміду. Реакції ферментативного гідролізу проводили протягом 30 хв при температурі +25°C, що приблизно відповідає температурному оптимумові прояву активності досліджуваного ферменту в системі *in vitro* [8]. Потім гелі сканували, отримані електрофореграми зберігали у форматі *bmp*. Показники відносної електрофоретичної рухливості (*R_f*) розраховували за допомогою комп'ютерної програми «TotalLab».

Використовуючи отримані електрофореграми, встановлювали фенотипи і відповідні їм генотипи за наявністю чи відсутністю в гелевом блоці тих чи інших продуктів алельних генів локусу β -естерази. Очікувані частоти генотипів і алелів за локусом β -естерази у вибірці *N*=40 знаходили, користуючись рівнянням Харді-Вайнберга. Відповідність спостережуваного розщеплення ознак теоретично очікуваному оцінювали за допомогою методу χ^2 [6].

Ефект «пляшкового горла» був викликаний надзвичайно високою температурою (31–32°C) у липні – серпні 2012 р., яка призвела до тимчасового пригнічення фертильності мух лабораторних популяцій *D. mercatorum* і *D. simulans* та їх масової загибелі (під час підвищення температури мухи культивували поза термостатом). До початку вересня в раніше численних популяціях налічувалося лише по кілька пар особин. Нормалізація температурного режиму забезпечувала швидке відновлення чисельності популяцій, що дало нам змогу вивчити їхню генетичну структуру за вказаним локусом.

Результати і їхнє обговорення

Гістохімічне виявлення ізоформ β -естерази показало наявність у *D. simulans* двох, а у *D. virilis* і *D. mercatorum* – трьох розчинних форм цього ферменту. Всі ізоформи добре проявляються на електрофореграмах у разі використання як субстрату β -нафтолу оцтової кислоти, що дає змогу безпомилково ідентифікувати ці форми як самостійні продукти алелів локусу β -*Est* (алозими) (рис. 1). Це підтверджує і той факт, що зазначені ізоформи мають подібні властивості: розчинність, електрофоретичну рухливість, субстратну специфічність і т. п. Усе це також свідчить про те, що у різних видів дрозофіл досліджувані ферменти є

гомологами (ортологами). Крім β -естерази, серед ферментів дрозофіл β -нафтилацетат здатна розщеплювати також ацетилхолінестераза, але вона, будучи тетрамерним ферментом, має значно меншу величину R_f і легко ідентифікується на електрофореграмі [2].

У досліджуваній популяції *D. simulans* β -естераза представлена двома формами – алозимами *S* та *F*, що мають різні показники відносної електрофоретичної рухливості (R_f 0,215 і 0,230, відповідно) та рівні експресивності (рис. 2). Те, що це саме алозими, тобто продукти алелей одного гена, а не ізозими (продукти різних генів), було показано ще в 1963 р. Райтом [9].

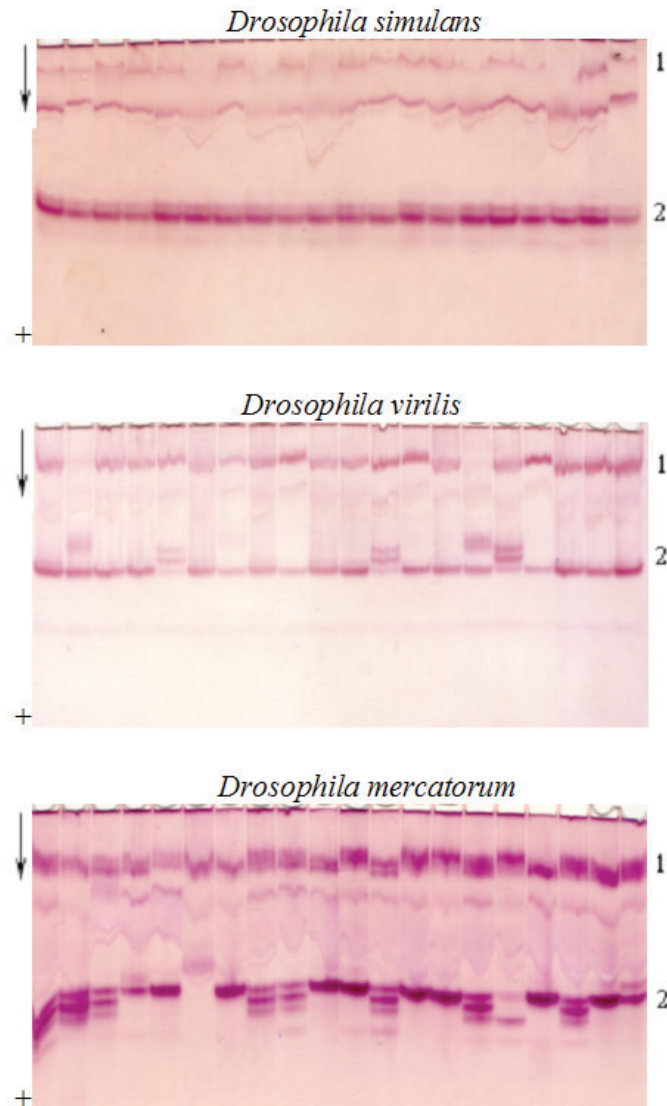
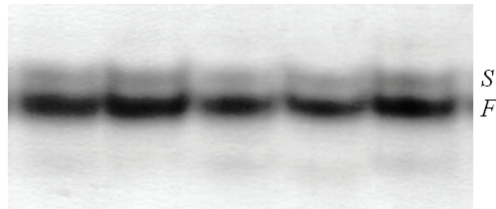
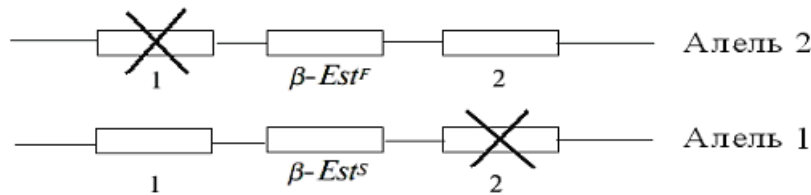


Рис. 1. Експресія естераз в імаго дрозофіл, визначена за β -нафтилацетатом: 1 – ацетилхолін естераза; 2 – β -естераза; стрілкою вказано напрямок руху ферментів у гелевому блоці в ході електрофорезу.

Рис. 2. Алозимний спектр β -естерази у *Drosophila simulans*.

Судячи з алозимного складу, який визначає фенотип кожної окремо взятої особини за ознакою експресії β -естерази, потенційно можливі такі генотипи за локусом β -*Est*, представленому двома алелями (*S* і *F*): *SS* – гомозиготи, *SF* – гетерозиготи і *FF* – гомозиготи. Однак у досліджуваній нами популяції *D. simulans* на момент проведення експериментальної частини роботи були відсутні особини, гомозиготні за даним локусом; у вибірці з 80 особин (40 самок і 40 самців) усі особини виявилися гетерозиготними. Це свідчить про те, що гомозиготи як за *F*-, так і за *S*-алелем є нежиттєздатними і на них спрямована дія негативного добору. Ми припускаємо, що це пов'язано з двома летальними чи сублетальними мутаціями, котрі проявляються в гомозиготному стані у двох генах, які входять до групи зчеплення з β -*Est*. У цьому разі мутація в першому гені виникає в одному алелі, а в другому гені – в іншому алелі (рис. 3).

Рис. 3. Гіпотетична схема, що пояснює нежиттєздатність гомозиготних за локусом β -*Est* особин *Drosophila simulans*: 1 і 2 – гени, що перебувають у зчепленні з геном β -*Est*; символ перекреслення означає летальну чи сублетальну мутацію.

Цікаво те, що, за даними інших авторів [9], у лабораторних популяціях *D. simulans*, створених із різних природних популяцій (із Південної та Північної Америки, Північної Африки), трапляються або тільки гомозиготи за одним із алелів, або і гомо-, і гетерозиготи. Отже, описаний нами феномен нежиттєздатності гомозигот за локусом β -*Est* характерний тільки для даної лабораторної популяції. Проте це явище потребує додаткових досліджень.

Із трьох ізоформ β -естерази *D. mercatorum* електрофоретично рухливіша (*F*) характеризується значенням $Rf=0,250$, найменш рухлива (*S*) – $Rf=0,220$. Також є і третя форма, з $Rf=0,235$. Згідно з даними літератури [7], β -естераза *D. mercatorum*, ймовірно, являє собою димер. Це може пояснювати наявність трьох електроморф (алозимів), дві з яких (*S* і *F*) утворюються в результаті гібридизації продуктів одного алеля (гомодимери), а третій (*M*) – двох (гетеродимер). Таким чином, фракція *S*-алозиму в гелевому блоці відповідає генотипові *SS*, фракція *F*-алозима – генотипу *FF*, а фракція *S*-, *M*- і *F*-алозимів – генотипу *SF* (рис. 4).

У даній вибірці ($N=40$) переважають гомозиготи за алелем *S* – 70%. Гетерозиготи *FS* становили 27,5%, а гомозиготи *FF* – лише 2,5%. Спостережуване співвідношення генотипів у експериментальній популяції збігається з теоретично очікуваним розподілом гомозигот

і гетерозигот у численній реальній панміктичній популяції. Розрахований показник χ^2 становив у цьому випадку 0,017, що значно нижче табличного значення (5,99). Частоти *S*- і *F*-алелів становлять відповідно 0,842 і 0,158.

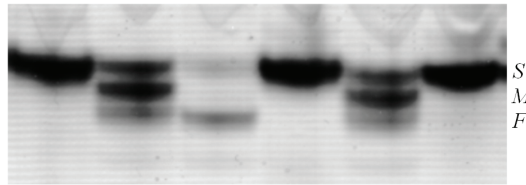


Рис. 4. Алозимний спектр β -естерази у *Drosophila mercatorum*.

У *D. virilis* β -естераза, ймовірно, теж має димерну структуру, оскільки в популяції вона також представлена трьома алозимами (рис. 5).

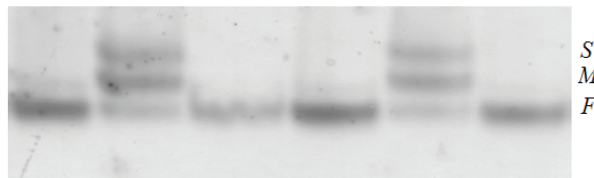


Рис. 5. Алозимний спектр β -естерази у *D. virilis*.

Частота появи гомозиготного генотипу *FF* становить 85%, а гетерозиготного – 15%. Примітно те, що в досліджуваній вибірці повністю були відсутні гомозиготи *SS*. Частоти *F*- і *S*-алелів становлять відповідно 0,925 і 0,075.

Цікаво також те, що протягом двох років культивування (2011–2012 рр.) всі особини *D. virilis* були гомозиготними за локусом β -*Est* і мали генотип *FF*, і лише в кінці 2012 р. з'явилися гетерозиготні форми. Ймовірно, сталася спонтанна мутація, яка в подальшому закріпилася у досліджуваній популяції. Те, що мутація закріпилася, а не відсіялася добором, свідчить про те, що носії *S*-алеля не поступаються за пристосованістю гомозиготам *FF*, а їх низька частота пояснюється більш пізнім закріпленням у популяції.

Після проходження через «пляшкове горло», що призвело до масової смертності мух в умовах підвищеної температури, співвідношення генотипових класів *D. simulans* не змінилося – як і раніше, були наявні тільки гетерозиготи, тоді як у генетичній структурі популяції *D. mercatorum* відбулися зміни. Гомозиготи *SS* становили 50% і стільки ж – гетерозиготи *SF*. Гомозигот *FF* у вибірці не було. Частоти *S*- і *F*-алелів становили відповідно 0,750 і 0,250. Ймовірно, зміна співвідношення генотипових класів була обумовлена звичайним дрейфом генів. Асиметрія генетичної структури популяції *D. mercatorum* до масової загибелі, ймовірно, також була викликана дрейфом генів, що мав місце при первинному введенні мух у культуру. На розмір популяції *D. virilis* підвищення температури не вплинуло.

Результати дослідження, проведеного раніше А. М. Андрієвським і В. Н. Тоцьким на Одеській популяції *D. melanogaster* [3], свідчать про те, що у лабораторній популяції цього виду мух алелі досліджуваного локуса (β -*Est*) також представлені нерівномірно. Частота *S*-алеля (домінантного) становила 0,807, а *F*-алеля (рецесивного) – 0,193. Частоти генотипів за цим локусом становили: *SS* – 0,667, *SF* – 0,280 і *FF* – 0,053. У цьому разі популяція *D. melanogaster*, що слугувала об'єктом дослідження А. М. Андрієвського і В. М. Тоцького, перебувала в тих самих умовах, що і популяції мух, які досліджувались у даній роботі. Отримані в обох експериментах результати представлені у таблиці.

Таблиця 1

Генетична характеристика лабораторних популяцій окремих видів дрозофіл, поліморфних за локусом β -Est

Популяційні параметри	Значення популяційних параметрів			
	<i>D. virilis</i>	<i>D. simulans</i>	<i>D. mercatorum</i>	<i>D. melanogaster</i>
N	> 500	> 500	> 500	> 500
n	40	80	40	360
n_{SS}	0	0	28	240
n_{SF}	6	80	11	101
n_{FF}	34	0	1	19
$p_{(S)}$	0,075	0,5	0,842	0,807
$q_{(F)}$	0,925	0,5	0,158	0,193
p_{SS}^2	0	0	0,700	0,667
$p_{q_{SF}}$	0,150	1	0,275	0,280
q_{FF}^2	0,850	0	0,025	0,053

Примітка. N – чисельність популяції в цілому; n – чисельність особин у вибірках; n_{SS} – чисельність гомозиготних домінантів; n_{SF} – чисельність гетерозигот; n_{FF} – чисельність гомозиготних рецесивів; $p_{(S)}$ – частота домінантного алеля; $q_{(F)}$ – частота рецесивного алеля; p_{SS}^2 – частота домінантного генотипу; $p_{q_{SF}}$ – частота гетерозиготного генотипу; q_{FF}^2 – частота рецесивного генотипу (частоти генотипів і алелів представлені в частках від 1).

Частоти S - і F -алелів локусу β -естерази у вивчених популяціях становлять для *D. mercatorum* відповідно 0,842 і 0,158, а для *D. virilis* – 0,075 і 0,935. У популяції *D. simulans* обидва алелі трапляються з однаковою частотою (0,500).

Частоти генотипів за локусом β -естерази становлять для *D. mercatorum*: SS – 0,700, SF – 0,275, FF – 0,025; для *D. virilis*: SS – 0,000, SF – 0,150, FF – 0,850; для *D. simulans*: SS – 0,000, SF – 1,000, FF – 0,000. Гомозиготні за локусом β -естерази генотипи *D. simulans* є нежиттєздатними і, ймовірно, на них діє негативний добір, тоді як асиметрія генетичної структури популяцій *D. mercatorum* і *D. virilis* викликана дрейфом генів.

Після проходження кризи «пляшкове горло» співвідношення генотипових класів SS і SF у рівноважній популяції *D. mercatorum* змінилося і стало однаковим (відповідно 0,500 і 0,500). Клас FF у вибірці був відсутній. Співвідношення генотипових класів у популяціях *D. simulans* і *D. virilis* не змінилося.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. М.: Мир, 1984. 230 с.
2. Андрієвський А. М. Влияние химических реагентов на проявление активности карбоксиэстераз *Drosophila melanogaster* // Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии: материалы II Междунар. конф. Одесса: Печатный дом, 2010. С. 8–16.
3. Андрієвський А. М., Тоцький В. Н. Генетическая структура экспериментальной популяции *Drosophila melanogaster*, полиморфной по локусу β -фильной эстеразы // Цитология и генетика. 2006. № 6. С. 3–10.
4. Кайданов Л. З. Генетика популяций. М.: Высшая школа, 1996. 320 с.
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. Ferreira S. M., Magalhaes L. E., Toledo S. A, Mogolowkin-Cohen Ch. A study of esterase isozymes in *D. mercatorum pararepleta* (*Drosophila. Diptera*) // Rev. Brasil. Genet. 1981. Vol. 4. N 3. P. 309–316.
8. White M. M., Mane S. D., Richmond R. C. Studies of Esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. XVIII. Biochemical differences between the slow and fast allozymes // Mol. Biol. Evol. 1988. Vol. 5. N 1. P. 41–62.
9. Wright T. R. F., Macintyre R. J. A homologous gene-enzyme system, esterase 6, in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* // Genetics. 1963. Vol. 48. P. 1717–1726.

Стаття: надійшла до редакції 14.11.14

доопрацьована 12.03.14

прийнята до друку 23.05.14

THE FREQUENCIES OF GENOTYPES AND ALLELES OF β -ESTERASE LOCUS IN LABORATORY POPULATIONS OF SOME *DROSOPHILA* SPECIES

S. Pasternak, A. Andrievsky

Odessa National I. I. Mechnikov University
2, Dvoryanska St., Odessa 65026, Ukraine
e-mail: biopaster@gmail.com

The frequencies of the alleles and genotypes of the locus β -esterase (E.C. 3.1.1.1) in artificial populations of *Drosophila virilis* (Sturtevant, 1916), *D. simulans* (Sturtevant, 1919) and *D. mercatorum* (Patterson et Weeler, 1942), created from their natural populations of Kiev and Odessa regions, have been studied with the polyacrylamide disc-electrophoresis followed by histochemical detection of enzyme fractions. Three allozymes of β -esterase and two genotypic classes – heterozygotes and dominant homozygotes have been found in *D. virilis*. Two allozymes of corresponding enzyme and one phenotypic class (heterozygotes) have been detected in *D. simulans*. Three allozymes and three phenotypic classes non-uniformly presented among the population have been detected in *D. mercatorum*. The frequencies of the alleles encoding corresponding allozymes of β -esterase and corresponding genotype frequencies have been determined. The deviations of the detected genotype frequencies from theoretically expected ones were determined. The role of natural selection directed towards some *D. simulans* genotypes is discussed. In addition, the influence of the «bottlenecks-effect» in the frequency of alleles and genotypes in the test laboratory populations has been investigated.

Keywords: β -esterase, allozymes, frequencies of alleles and genotypes, *Drosophila*.

**ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ
ПО ЛОКУСУ β -ЭСТЕРАЗЫ В ЛАБОРАТОРНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ
ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ДРОЗОФИЛ**

С. Пастернак, А. Андрієвський

*Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова
ул. Дворянская, 2, Одесса 65026, Украина
e-mail: biopaster@gmail.com*

Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле с последующим гистохимическим выявлением ферментных фракций определяли частоты генотипов и аллелей по локусу β -эстеразы (К.Ф. 3.1.1.1) в лабораторных популяциях *Drosophila virilis* (Sturtevant, 1916), *D. simulans* (Sturtevant, 1919) и *D. mercatorum* (Patterson et Weeler, 1942), созданных из природных популяций Киевской и Одесской области. У *D. virilis* обнаружены три аллели β -эстеразы и два генотипических класса – гетерозиготы и гомозиготы доминантные. У *D. simulans* обнаружены два аллели соответствующего фермента и один генотипический класс – гетерозиготы. У *D. mercatorum* обнаружены три аллели и три генотипических класса, неравномерно представленные в популяции. Определены частоты аллелей, кодирующих соответствующие аллели β -эстеразы, а также частоты соответствующих генотипов. Установлены отклонения наблюдаемых частот генотипов от теоретически ожидаемых. Рассматривается вопрос о влиянии естественного отбора, направленного против определенных генотипов *D. simulans*. Кроме того, исследовано влияние эффекта «бутылочного горлышка» на частоты аллелей и генотипов в исследуемых лабораторных популяциях.

Ключевые слова: β -эстераза, аллели, частоты аллелей и генотипов, дрозофила.