

УДК 575.22, 575.167
DOI: 10.20310/1810-0198-2016-21-5-1867-1870

ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕТОТРЕКСАТА НА ЛИНИИ ДИКОГО ТИПА И ГИБРИДНЫЕ ЛИНИИ ГЕТЕРОЗИГОТНЫЕ ПО ГЕНУ *VESTIGIAL DROSOPHILA MELANOGASTER*, ПОЛУЧЕННЫЕ В ХОДЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ НАПРАВЛЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ

© О.Н. Антосюк

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина
620002, Российская Федерация, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19
E-mail: antosuk-olga@mail.ru

Drosophila melanogaster является удобным модельным объектом для изучения последствий длительной направленной селекции благодаря короткому жизненному циклу и быстрой смене поколений. В связи с тем, что многие факторы стресса химической и физической антропогенной природы способны вызывать активизацию перемещения мобильных генетических элементов, целью данной работы являлось установить изменение транспозонной активности у ряда линий *D. melanogaster* при воздействии лекарственного препарата метотрексата либо при скрещивании с мутантной линией *vestigial* в ходе длительной направленной селекции. Повреждения типа «вырезки» на крыле получали двумя способами: выращивали особей линий дикого типа на среде, содержащей метотрексат, или скрещивали с особями мутантной линии *vestigial* (признак рудиментарные крылья). Используя морфометрический анализ крыла, мы показали линейные различия, проявляющиеся в ответ на направленную селекцию. Таким образом, выдвинуто предположение об изменении активности транспозонов, наличие и локализация во всех хромосомах которых подтвердили с помощью ПЦР и FISH-методов. Появление мутаций у гибридов, гетерозиготных по аллели *vestigial*, также свидетельствует в пользу данного предположения.

Ключевые слова: метотрексат; транспозоны; *vestigial*

ВВЕДЕНИЕ

Drosophila melanogaster использована для изучения последствий длительной направленной селекции благодаря короткому жизненному циклу и быстрой смене поколений. Частота повреждений типа «вырезка» на крыле колеблется в ходе направленной селекции в присутствии метотрексата, что связывают с активностью фермента дигидрофолатредуктаза. Интенсивность апоптоза определили, используя морфометрический анализ крыловой пластинки по 24 показателям. В работе использовали ряд линий дикого типа, отловленных в природе и культивируемых впоследствии в лабораторных условиях. Применяли как косвенные методы определения нестабильности генома, так и прямые, такие как ПЦР-анализ и FISH-анализ. Таким образом, показано изменение копийности транспозонов при воздействии метотрексатом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован ряд гибридных линий и линий дикого типа *D. melanogaster*: «Биос-3×vg», «Host×vg» и «vg×Дегтярск», «Белгород×vg», «Host», «Белгород», «Биос-3». Метотрексат добавляли в питательную среду в концентрации 2 мкг/кг среды. Отбор вели на наличие повреждений на обоих крыльях типа «вырезка». Применяли морфометрический анализ крыловой пластинки по 24 параметрам (18 линейных и 6 двумерных). Использовали дискриминантный анализ (Statistica 6.0). Изменение копийности *hobo* и *hobo-*

подобных элементов определяли с помощью ПЦР-метода. Наличие транспозонов *P* и *hobo* устанавливалось с помощью FISH-метода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В линии «Биос-3» (Двуреченск, 2007) частота повреждений максимальна лишь в самом начале эксперимента, после чего она стабилизировалась и держалась практически на одном уровне. Что касается линии «Host» (Екатеринбург, 2005), частота повреждений, наблюдаемая в ходе отбора, всегда была выше, чем в линиях «Биос-3» и «Белгород». В линии «Белгород» (Белгород, 2006) частота повреждений типа «вырезка» на крыле максимального значения достигла незадолго до гибели всех особей в данной линии в ходе направленной селекции.

В работе провели анализ жизнеспособности и изменения пространственной структуры крыла у линий дикого типа, изменяющиеся при воздействии метотрексатом, усиливающим апоптоз и изменением генотипической среды, в присутствии мутантной аллели *vestigial*, также усиливающей апоптоз.

Исходное наличие транспозонов в используемых линиях определялось при помощи флуоресцентной гибридизации *in situ*. Было показано наличие как *hobo*, так и *P* элемента во всех 4 хромосомах. Использовали линию «Биос-3» и «Host».

Обнаружены транспозоны, локализацию которых удается определить, например, в линии «Биос-3», в X-хромосоме заметно расположение в начале трех *P*-эле-

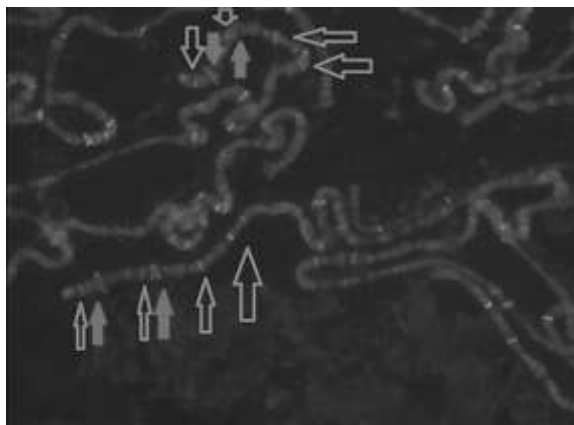


Рис. 1. Препарат слюнных желез личинок линии «Host». Локализация *P*-элемента показана закрашенными стрелками, локализация *hobo* – элемента показана контурными стрелками

ментов, затем три *hobo*-элемента, средний из которых упакован между двумя *P*.

Что касается линии «Host», то можно наблюдать в начале X-хромосомы чередование *hobo-P-hobo-P-hobo-hobo-hobo-hobo* (рис. 1).

Подтверждение присутствия транспозонов *hobo* и *P* в используемых в работе линиях послужило для использования этих линий в дальнейших исследованиях, посвященных длительной направленной селекции на повреждение крыла типа «вырезка», наличие которой является одним из показателей генотоксического и тератогенного эффекта при воздействии метотрексата. Данный показатель применялся на трех линиях дикого типа «Биос-3», «Белгород» и «Host». Наибольшая частота встречаемости повреждений типа «вырезка» на крыле наблюдается в течение всего отбора, в линии «Host» F_{54} она достигает 80,7%. Изменение активности мобильных генетических элементов как в ходе длительного отбора при воздействии факторов стресса, так и при единичном воздействии косвенно демонстрирует морфометрический анализ крыла [1]. Данный анализ использовали для обнаружения различий в линейных параметрах и площадях крыловых ячеек особей после воздействия метотрексатом дозой 2 мг/кг, а также метотрексатом на протяжении нескольких десятков поколений. В линиях «Биос-3» и «Host» после длительной направленной селекции все площади ячеек крыла изменяются относительно контрольной группы и поколения, впервые выращенного на метотрексате.

В линии «Белгород» изменению подлежат лишь параметры верхней части крыловой пластинки.

Таким образом, на основании результатов, полученных в ходе дискриминантного анализа морфометрических показателей крыла, установили, что линия дикого типа «Белгород» отличается от линий дикого

типа «Биос-3» и «Host» в отношении уровня онтогенетической и генотипической адаптации при воздействии факторов стресса. Для определения геномной нестабильности использовали ПЦР-метод, в ходе которого оценивали изменение копийности *hobo* и *hobo*-подобных элементов. Копийность *hobo* и *hobo*-подобных элементов (относительно гена *scalloped*) после первичного воздействия метотрексатом у всех трех линий дикого типа уменьшается, но впоследствии в ходе длительной направленной селекции линейные различия становятся более выраженными, т. к. количество *hobo* и *hobo*-подобных элементов изменяется в линиях по-разному (табл. 1).

Полученные нами результаты свидетельствуют о влиянии метотрексата как на генеративные, так и на соматические клетки у *D. melanogaster*. Как известно из литературных данных [2], при влиянии внешних стрессовых факторов в первую очередь воздействию фактора стресса подвергаются именно генеративные клетки, вплоть до полной стерилизации особи. Влияние же на соматические клетки (в т. ч. и дорзально-мезоторакального диска) долгое время оспаривалось, но теперь получен ряд данных, свидетельствующих в пользу предположения о том, что соматические клетки так же подвергнуты влиянию стресса, как и генеративные клетки [3]. Известно, что именно *hobo*-элемент наиболее распространен и активен в линиях дикого типа, отловленных в природе, что демонстрируется в ряде работ на линии Умань, наличие и активность *hobo* и *P* элементов в которой определяется с использованием как ПЦР, так и флуоресцентной гибридизации *in situ* [4]. Также в ряде других работ, проведенных как на особях дикого типа, так и на мутантных лабораторных линиях, показана активная роль транспозонов в формировании адаптации [5–6]. Результаты, полученные в ходе эксперимента, направленного на воздействие метотрексата в течение длительной направленной селекции на усиление апоптоза в крыле, также позволяют сделать, хотя и косвенный, вывод об изменении активизации мобильных генетических элементов. Молекулярно-генетический анализ копийности *hobo*-элемента подтвердил уменьшение количества *hobo* и *hobo*-подобных элементов в линии «Белгород», что можно объяснить возможностью эксцизии транспозонов [7]. Две линии дрозофилы характеризуются увеличением количества *hobo*-элементов при инбридинге, а одна линия имеет обратную тенденцию, что можно объяснить возможностью эксцизии транспозонов [7]. Последующая селекция привела к тому, что особи данной линии откладывали единичные яйца, практически не развивающиеся либо неоплодотворенные, что впоследствии привело к гибели линии, достигшей 74 поколения отбора. Высокая частота встречаемости повреждений типа «вырезка» на крыле, наблюдаемая в течение последних нескольких поколений, и соответствующую

Таблица 1

Количество копий *hobo* и *hobo*-подобных элементов в экспериментальных группах дрозофилы

Генотип	Количество	Генотип	Количество	Генотип	Количество
Host Контроль	165140 ± 2,49	Белгород Контроль	2431362 ± 1,42	Биос-3 Контроль	554182 ± 3,68
Host P	2568 ± 3,43	Белгород P	94629 ± 1,38	Биос-3 P	441892 ± 1,38
Host F_{60}	536543 ± 1,67	Белгород F_{72}	6039 ± 3,73	Биос-3 F_{76}	9200835 ± 2,25

щая направленная селекция на повреждение крыла привели к тому, что были отобраны особи с высокой степенью апоптоза и крайне низким количеством копий *hobo*-элементов, что в условиях стресса могло спровоцировать гибель особей.

Результаты длительной направленной селекции на метотрексате сравнили с результатами исследований гетерозигот, полученных с использованием линии, характеризующейся рецессивной морфологической мутацией *vestigial* (*vg*, П: 57,0 сМ), выделенной в 1912 г. В 1970-е гг. во Франции была осуществлена серия реципрокных скрещиваний мутантной линии *vg* с 18 линиями дикого типа, отловленных в природе [8]. В ходе этих экспериментов было обнаружено, что в отдельных скрещиваниях уже в F₁ дистальная часть крыла гетерозиготных мух обнаруживала дефекты в виде «вырезок» на крыле. Частота появления повреждения крыла у гетерозиготных особей *vg*⁺/*vg* в зависимости от линии дикого типа изменялась в пределах от 0,2 до 74,4 % [8–9]. Известно, что в ходе нормального развития крылового диска взаимодействуют продукты генов *scalloped* (*sd*, X:1-51,5 сМ) и *vestigial*. Направленный отбор на повреждение крыла типа «вырезка» привел к появлению мутаций в трех линиях из четырех используемых в работе. Индуцированный мутагенез наблюдался в линиях «Биос-3×*vg*», «Host×*vg*» и «*vg*×Дегтярск». В линии «Белгород×*vg*» за 148 поколений отбора не обнаружено явления возникновения мутаций. В линии «Биос-3×*vg*» обнаружена в F50 мутация *white*, характеризующаяся отсутствием пигмента в глазах дрозофилы. В линии «Host×*vg*» обнаружена мутация *scalloped*, проявляющаяся в зазубренном крае крыла у дрозофилы. И в линии «*vg*×Дегтярск» обнаружена мутация *yellow*, определяемая как желтое тело у дрозофилы. Последние 2 мутации возникли еще до 20 поколений направленного отбора, т. е. на начальных этапах селекционного процесса. С помощью морфометрического анализа крыла установили, что при длительной направленной селекции различия в крыловых параметрах становятся более выраженными с ходом отбора. В экспериментах с линиями «Дегтярск» и «Host» экспериментальные выборки отчасти перекрываются, что связано, как мы предполагаем, с малой продолжительностью отбора гибридных особей. В линиях «Биос-3» и «Белгород» различия более явные и выборки не перекрываются, ведь отбор в этих линиях ведется почти 150 поколений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов морфометрического анализа показано изменение пространственной структуры

крыла у гибридных линий, полученных с использованием линий дикого типа и мутантной линии *vestigial*, подвергнутых длительной направленной селекции с изменением пространственной структуры крыла с линиями, подвергшимися длительной направленной селекции в присутствии метотрексата. Несмотря на то, что в обоих случаях происходит изменение активности дигидрофолатредуктазы, пространственная структура крыла в случае химического стресса отличается от таковой при направленном отборе на усиление апоптоза в крыловом имагинальном диске у гетерозигот по *vestigial*. Возникновение мутаций в ходе селекции подтвердило наше предположение о возможной активизация транспозонов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антосюк О.Н., Марвин А.М., Марвин Н.А. Сравнительный анализ воздействия цитостатических препаратов на нестабильность генома *Drosophila melanogaster* // Биомедицина. 2014. № 3. С. 83-91.
2. Kislukhin G., King E.G., Walters K.N. et al. The genetic architecture of methotrexate toxicity is similar in *Drosophila melanogaster* and humans // G3 (Bethesda). 2013. V. 3. P. 1301-1310.
3. Kazazian H. Jr. Mobile DNA transposition in somatic cells // BMC Biol. 2011. V. 8. P. 1-4.
4. Захаренко Л.П., Воложина М.А., Захаров И.К. Влияние генетического окружения на локус-специфичную нестабильность в гене *yellow* *Drosophila melanogaster* из Умани // Генетика. 2007. Т. 43. № 7. С. 938-942.
5. Kofler R., Nolte V., Schlotterer K. Tempo and Mode of transposable element activity in *Drosophila* // PLoS Genet. 2015. V. 11. № 7. P. 1-21.
6. Beiles A., Raz S., Ben-Abu Y., Nevo E. Putative adaptive inter-slope divergence of transposon frequency in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) at "Evolution Canyon". Mount, Carmel, Israel // Biology Direct. 2015. V. 10. P. 1-18.
7. Atkinson P.W., Warren W.D., O'Brochta D.A. The hobo transposable element of *Drosophila* can be cross-mobilized in houseflies and excises like the Ac element of maize // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. № 20. P. 9693-9697.
8. Goux J.M., Paillard M. Analyse de la penentransincomplet locus *vestigial* chez la *Drosophila* // C.R. Acad. Sci. Paris. 1976. V. 285. P. 667-669.
9. Riedel H. Der Einfluss der Entwicklungstemperatur und Flugel-Tibialange von *D. melanogaster* (wild, *vestigial*) und die reziproken Kreuzung // W. Roux Archiv. 1934. V. 132. P. 463-509.

БЛАГОДАРНОСТИ:

1. Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Российской Федерации, постановление № 211 контракт № 02.A03.21.0006
2. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-31654.
3. Автор выражает благодарность Л.П. Захаренко за помощь в работе, посвященной флуоресцентной гибридизации *in situ*.

Поступила в редакцию 24 мая 2016 г.

Антосюк Ольга Николаевна, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Российская Федерация, ассистент кафедры зоологии, e-mail: antosuk-olga@mail.ru

Информация для цитирования:

Антосюк О.Н. Воздействие метотрексата на линии дикого типа и гибридные линии гетерозиготные по гену *vestigial* *Drosophila melanogaster*, полученные в ходе длительной направленной селекции // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. Тамбов, 2016. Т. 21. Вып. 5. С. 1867-1870. DOI: 10.20310/1810-0198-2016-21-5-1867-1870.

Antosyuk O.N. Vozdeystvie metotreksata na linii dikogo tipa i gibridnye linii geterozigotnye po genu *vestigial* *Drosophila melanogaster*, poluchennye v khode dlitel'noy napravlennoy seleksii [The influence of methotrexat on the branch of wild type and hybrid branches of heterozygous according to the gene *vestigial* *Drosophila melanogaster*, received in the process of controlled breeding]. *Vestnik Tambovskogo universiteta. Seriya Estestvennye i tekhnicheskie nauki – Tambov University Review. Series: Natural and Technical Sciences*, 2016, vol. 21, no. 5, pp. 1867-1870. DOI: 10.20310/1810-0198-2016-21-5-1867-1870. (In Russian).

**THE INFLUENCE OF METHOTREXAT ON THE BRANCH OF WILD TYPE
AND HYBRID BRANCHES OF HETEROZYGOUS ACCORDING
TO THE GENE *VESTIGIAL DROSOPHILA MELANOGASTER*,
RECEIVED IN THE PROCESS OF CONTROLLED BREEDING**

© O.N. Antosyuk

Ural State University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin
19 Mira St., Yekaterinburg, Russian Federation, 620002
E-mail: antosuk-olga@mail.ru

Drosophila melanogaster is a convenient model object for studying of consequences of the long directed selection because it has a short life cycle and fast alternation of generations. Many factors of a stress of the chemical and physical nature are capable to cause activation of movement of mobile genetic elements by the purpose of this work was to establish change of transposon's activity at a number of the *D. melanogaster* strains at methotrexate influence, or when crossing with the mutant strain *vestigial* during the long directed selection. The injuries like "cutting" on a wing were received in 2 ways: grew up individuals of wild type strains on the medium, which containing a methotrexate or crossed to individuals of the mutant *vestigial* (a sign rudimentary wings). Using the morphometric analysis of a wing showed the linear distinctions which are shown in response to the directed selection. Thus, the assumption of change of activity of transposons is made, existence and localization in which all chromosomes were confirmed by PCR and FISH method. Emergence of mutations in hybrids, heterozygotic *vestigial*, also testifies in favor of this assumption.

Key words: methotrexate; transposons; *vestigial*

REFERENCES

1. Antosyuk O.N., Marvin A.M., Marvin N.A. Sravnitel'nyy analiz vozdeystviya tsitostaticheskikh preparatov na nestabil'nost' genoma *Drosophila melanogaster* [The comparative analysis of influence of cytostatic drugs on genome instability of *Drosophila melanogaster*]. *Biomeditsina – Biomedicine*, 2014, no. 3, pp. 83-91. (In Russian).
2. Kislukhin G., King E.G., Walters K.N. et al. The genetic architecture of methotrexate toxicity is similar in *Drosophila melanogaster* and humans. *G3 (Bethesda)*, 2013, vol. 3, pp. 1301-1310.
3. Kazazian H. Jr. Mobile DNA transposition in somatic cells. *BMC Biol.*, 2011, vol. 8, pp. 1-4.
4. Zakharenko L.P., Volozhina M.A., Zakharov I.K. Vliyaniye geneticheskogo okruzheniya na lokus-spetsifichnuyu nestabil'nost' v gene yellow *Drosophila melanogaster* iz Umani [The effect of genetic environment on locus-specific instability of the yellow gene in Ulman' population]. *Genetika – Russian Journal of Genetics*, 2007, vol. 43, no. 7, pp. 938-942. (In Russian).
5. Kofler R., Nolte V., Schlotterer K. Tempo and Mode of transposable element activity in *Drosophila*. *PLoS Genet.*, 2015, vol. 11, no. 7, pp. 1-21.
6. Beiles A., Raz S., Ben-Abu Y., Nevo E. Putative adaptive inter-slope divergence of transposon frequency in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) at "Evolution Canyon". Mount, Carmel, Israel. *Biology Direct*, 2015, vol. 10, pp. 1-18.
7. Atkinson P.W., Warren W.D., O'Brochta D.A. The hobo transposable element of *Drosophila* can be cross-mobilized in houseflies and excises like the Ac element of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, no. 20, pp. 9693-9697.
8. Goux J.M., Paillard M. Analyse de la penetrance incomplexe du locus *vestigial* chez la *Drosophila*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1976, vol. 285, pp. 667-669. (In French).
9. Riedel H. Der Einfluss der Entwicklungstemperatur und Flugel-Tibialange von *D. melanogaster* (wild, *vestigial*) und die reziproken Kreuzung. *W. Roux Archiv*, 1934, vol. 132, pp. 463-509. (In German).

GRATITUDE:

1. The work is fulfilled under financial support decision no. 211 of the Russian Federation government, contract no. 02.A03.21.0006
2. The work is fulfilled under support of RFFR grant no. 14-04-31654.
3. The author thanks L.P. Zakharenko for help in work, devoted to FISH *in situ*.

Received 24 May 2016

Antosyuk Olga Nikolaevna, Ural State University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russian Federation, Assistant of Zoology Department, e-mail: antosuk-olga@mail.ru