

УДК 575.16:57.022:57.017.67:57.017.642:595.773.4

ИЗУЧЕНИЕ СТАДИЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ГИБЕЛИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И ГОЛОДАНИЯ ИМАГО

© 2015 г. В. В. Костенко, Н. В. Колот, Л. И. Воробьева

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

61022 Харьков, пл. Свободы, д. 4

E-mail: kostenkoviktoria88@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.02.2015 г.

Окончательный вариант получен 15.04.2015 г.

Изучено влияние возраста родителей, длительности голодания на яйцепродукцию и проявление эмбриональной гибели на разных стадиях развития яйца. Показано, что с увеличением возраста снижается яйцепродукция и увеличивается процент эмбриональной гибели на стадии 0–5½ и 5½–17 ч развития. Увеличение длительности голодания способствует также снижению яйцепродукции у 3-х и 10-ти дневных имаго *D. melanogaster* по сравнению с данными, полученными при непродолжительном голодании. Установлено статистически значимое влияние факторов: аллельное состояние локуса *white*, генетический фон, возраст родителей и длительность голодания на все изучаемые показатели.

Ключевые слова: *D. melanogaster*, аллели локуса *white*, старение, голодание, эмбриональная гибель.

DOI: 10.7868/S0475145015060063

Изучение генетически обусловленных и индуцированных нарушений раннего развития эмбрионов является актуальным вопросом, как в биологии развития, так и в репродуктивной медицине. Жизнеспособность ранних эмбрионов обусловлена многими факторами: зрелостью и генетическим статусом гамет, активацией эмбрионального генома, стадиоспецифической экспрессией генов, межклеточными взаимодействиями и т.д. Морфогенетические процессы на ранних стадиях онтогенеза дрозофилы, сходны с механизмами, контролирующими морфогенез у позвоночных животных. Например, транскрипционные факторы ТВР (*TATA box Binding Protein*) и TRF2 (*TATA box Related Factor 2*) регулируют экспрессию определенного набора генов, необходимы для нормального развития, как млекопитающих, так и *D. melanogaster* (Bashirullah, 1998 et al.).

Гаметогенез является одной из самых уязвимых стадий в развитии животных. Так, у *D. melanogaster* гаметогенез, особенно оогенез, чувствителен к экзогенным стресс-факторам: радиации, химическому воздействию, повышению или снижению температуры окружающей среды, голоданию и другим (Panagoroulos, 2012). Стресс может индуцировать клеточную гибель на стадии оогенеза, а также приводить к эмбриональной и пост-эмбриональной гибели организмов. В норме в

яичнике *D. melanogaster* может происходить запрограммированная гибель клеток в двух контрольных точках (checkpoint), одна из которых находится в гермарию, а другая – в вителларию, на 7–8 стадии оогенеза (Giorgi, Deri 1976; Drummond-Barbosa, Spradling, 2001). В работе (Drummond-Barbosa, Spradling, 2001), показано, что при голодании количество яйцевых камер, подвергающихся стресс-индуцированной гибели, в обеих контрольных точках увеличивается (Markow et al., 2009). Стресс может приводить к повреждению ДНК в ооцитах после оплодотворения, а также на ранних стадиях эмбриогенеза индуцировать нарушение расхождения хромосом, как в мейозе (в ооцитах самок), так и в последующих митотических делениях (в бластомерах на стадии дробления), конденсацию митотических хромосом, что может стать причиной гибели потомства (Abrams et al., 1993). Кроме этого, стресс способствует нарушению ядерного транспорта мРНК, что может привести к изменениям формирования позиционной информации, что, в свою очередь, индуцирует нарушение эмбриогенеза и гибель эмбриона или возникновение у него врожденных аномалий (Bashirullah et al., 1998; Hetzer et al., 2002). Сходство в изменение морфогенетических процессов у беспозвоночных и позвоночных в ответ на стрессорное воздействие свидетельствует о том, что реак-

ция на стресс — это совокупность механизмов, возникших и закрепленных в ходе эволюции (Ivanovic, Jankovic-Hladni, 1991; Neckameyer, Weinstein, 2005).

Помимо стресса, возраст также влияет на репродуктивную функцию организмов, особенно на оогенез, жизнеспособность эмбрионов и эмбриональное развитие (Adler et al., 2013; Костенко и др., 2014). У беспозвоночных, также как и у млекопитающих с возрастом отмечается снижение репродуктивной функции и увеличение гибели организма на эмбриональной стадии онтогенеза. Поэтому актуальным является изучение влияния стресс фактора (в частности, голодания) и возраста имаго на жизнеспособность эмбрионов *D. melanogaster* мутантных линий и дикого типа. В связи с этим целью данной работы было исследование стадий эмбрионального развития, на которых происходит гибель яиц *D. melanogaster* линий дикого типа и мутантных линий, различающихся аллелями локуса *white* при старении родителей и их голодании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования были использованы линии из коллекции кафедры генетики и цитологии ХНУ имени В. Н. Каразина: *Canton-S (C-S)*, *Oregon (Or)* — линии дикого типа и мутантные линии: *white (w¹)*, *white^{tinged} (w^t)*, *white^{apricot} (w^a)* и *white^{satsuma} (w^{sat})*, которые отличались степенью пигментации глаз ($w^1 < w^t < w^a < w^{sat}$). Для изучения яйцепродукции и нарушений в эмбриогенезе (по количеству и стадии возникновения эмбриональной гибели) виргинных 3 и 10 дневных имаго самок и самцов мутантных линий и линий дикого типа *Drosophila* содержали в стандартных и стресс-индуцированных (голодание) условиях. Всего в эксперименте было использовано 1200 имаго *Drosophila*.

Перед исследованием проводили насыщающие скрещивания в условиях направленного отбора на маркерную мутацию, как описано в работе (Костенко, 2012). Таким образом, линии были выровнены по генотипу (далее по тексту M_{C-S} — линия, у которой мутация переведена на генетический фон дикого типа *C-S*; M_{Or} — линия, у которой мутация переведена на генетический фон дикого типа *Or*). У выровненных по генотипу линий ($w_{C-S}, w_{C-S}^t, w_{C-S}^a, w_{C-S}^{sat}, w_{Or}, w_{Or}^t, w_{Or}^a, w_{Or}^{sat}$), можно было корректно оценить вклад аллелей данного локуса на проявление количественных признаков. Все вышеуказанные линии содержали в культуральных флаконах на стандартной сахарно-дрожжевой среде в термостате при температуре 23°C. Разделение имаго по полу осуществляли в первые сутки после выхода их из пупариума. В эксперимент брали только виргинных особей. Для наркотизации использовали диэтиловый эфир.

Самок и самцов всех линий возрастом 3 и 10 суток подвергали голоданию. При этом самок и самцов

всех исследуемых линий содержали отдельно (по 25 особей в каждой экспериментальной группе) в пробирках без питательной среды в течение 20 и 30 часов. После действия стресс — фактора для спаривания самок и самцов помещали вместе также в пробирки без питательной среды. Таким образом, общее время влияния фактора голодания составило 32 и 42 часа. После этого экспериментальные группы насекомых по 5 пар каждой линии отсаживали в чашки Петри со временной средой на 8 часов для получения яйцекладок. В качестве контроля использованы мухи того же возраста и той же линии, которых содержали на стандартной среде в стандартных условиях.

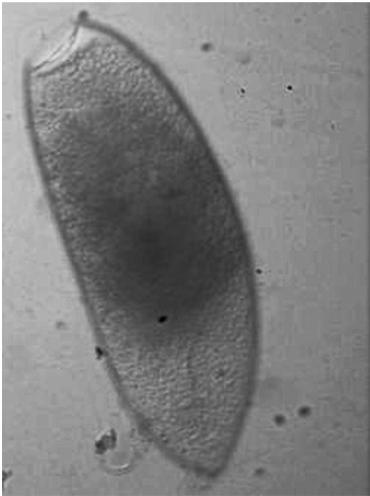
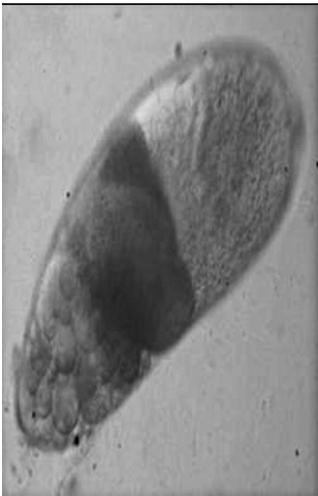
В качестве критерия возрастных и стресс-индуцированных (голодание) изменений, которые возникают в гаметях имаго, использовали показатель частоты доминантных летальных мутаций (ДЛМ) на разных стадиях эмбриогенеза. Оценивали частоту ранних (0–5½ и 5½–17 ч развития) и поздних (17–22 ч развития) доминантных летелей (рДЛМ и пДЛМ) — по проценту соответственно светлых (белого цвета) и темных (желтого цвета) неразвившихся яиц (Тихомирова, 1990). Частоту доминантных летальных мутаций определяли как соотношение неразвившихся яиц к общему количеству отложенных яиц. Для каждого варианта эксперимента было выполнено 5 измерений. Эксперимент проведен в 3-х повторях.

Стресс реактивность рассчитывали, как процент изменения признака в опытном варианте по отношению к среднему значению для контрольной группы.

Анализ стадии эмбрионального развития, на которой происходила гибель эмбрионов осуществляли по методу (Hill, 1945). Для этого неразвившиеся яйца каждой исследуемой линии извлекали иглой из временной среды и помещали в лунки с 3% раствором гидрохлорида натрия на 35 минут. Это способствовало расщеплению хориона и идентификации стадии эмбриональной гибели. Анализ яиц без хорионической оболочки фотографировали при помощи микроскопа Konus Campus 5306 с цифровой камерой — окуляром 3 M Pixels CCD Camera CMOS Camera. Обработку микрофотографий проводили при помощи программы “Fotoshop CS 5”.

Для оценки влияния факторов на исследуемые признаки использовали дисперсионный анализ. Силу влияния оценивали по методу М. Снедекора. Для анализа корреляционных связей между признаками использовали коэффициент корреляции рангов К. Спирмена (Лакин, 1990). При статистической обработке данных использовали программу STATISTICA 7.0. (Factorial ANOVA).

Таблица 1. Характеристика эмбрионов *D. melanogaster* 0–5½, 5½–17 и 17–22 часов эмбрионального развития

рДЛМ		пДЛМ
		
0–5½ ч Начальные стадии дробления и образования бластодермы.	5½–17 ч Стадия гастрюляции и сегментации эмбриона, гистогенез.	17–22 ч Стадия органогенеза и выход личинки из хориона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные по количеству отложенных яиц за 12 часов 3-х дневными самками *D. melanogaster* изучаемых линий представлены в таблице 1. При этом минимальные значения были получены для мутантной линии w_{C-S}^{sat} , а максимальные – для w_{C-S}^t ($p < 0.05$). Сравнение яйцепродукции между 3-х дневными линиями дикого типа показало, что у линии *Or* данный показатель на 6% выше, чем у *C-S*.

Голодание приводило к снижению яйцепродукции у всех 3-х дневных линий *D. melanogaster*. При 32 и 42 часовом голодании минимальные значения по яйцепродукции были получены для линии w_{Or} и w_{Or}^{sat} , а максимальные – для w_{C-S}^{sat} и w_{C-S} , соответственно.

При сравнении результатов яйцепродукции 10-ти дневных имаго дрозофил изучаемых линий при голодании в течение 12 часов минимальные значения были получены w_{C-S}^{sat} , а максимальные – для w_{Or}^{sat} . У линий дикого типа *C-S* при голодании в течение 12 часов данный показатель был ниже в 48 раз, чем у *Or* ($p < 0.05$). Голодание 10-ти дневных имаго в течение 32 и 42 часов способствует повышению яйцепродукции у линии дикого типа *C-S* в 5.6 и 2.8 раза, соответственно, по сравнению со значениями, полученными при 12 часовом голодании. Однако длительное голодание вызывало снижение яйцепродукции у линии *Or* по сравнению со значениями, полученными при кратковременном голодании.

Сравнительное изучение стадий гибели эмбрионов 3-х и 10-ти дневных имаго дикого типа и мутантных линий на фоне 12, 32, 42 часового голодания позволило разделить время эмбриональной гибели на 3 периода: 0–5½; 5½–17 и 17–22 часа (табл. 1).

У 3-х дневных родителей максимальная гибель на стадии 0–5½ ч отмечалась у w_{Or} ; 5½–17 ч – у w_{C-S}^t ; 17–22 ч – *Or* (табл. 2.1). Голодание 32 и 42 часовое способствовало увеличению гибели эмбрионов на поздних стадиях развития. Так при длительном голодании максимальные значения по показателю гибели эмбрионов на 0–5½ ч наблюдалось для w_{Or} и *C-S*; 5½–17 ч – w_{C-S} и w_{Or}^{sat} ; 17–22 ч – *Or* и *C-S* (табл. 2.2, 2.3).

С увеличением возраста имаго на фоне 12 часового голодания отмечалось снижение показателя эмбриональной гибели на поздних стадиях по сравнению с 3-х дневными родителями. На стадии 0–5½ ч отмечалась максимальная гибель эмбрионов линии w_{C-S}^t ; на стадии 5½–17 ч – *C-S*; на стадии 17–22 ч – *Or*, соответственно. На ранней (0–5½ ч) и поздней (17–22 ч) стадии эмбриогенеза не отмечалась гибель эмбрионов у 3-х дневных имаго линии w_{C-S}^a (табл. 2.1).

Следует отметить, что длительное голодание сопровождалось повышением эмбриональной гибели на более поздних стадиях. Однако, у 10-ти дневных имаго линий: w_{C-S} , w_{C-S}^a , w_{C-S}^{sat} и *C-S* 32 часовое голодание индуцировало гибель эмбрионов в основном на стадии 5½–17 ч и не вызывало ги-

Таблица 2.1. Средние значения показателя яйцепродукции (количество отложенных яиц) у имаго разного возраста мутантных линий и дикого типа и стадии эмбриональной гибели при 12 часовом голодании

Генотип	Возраст							
	3-х дневные имаго				10-ти дневные имаго			
	кол-во яиц (<i>n</i>)	стадии эмбрионального развития, часы			кол-во яиц (<i>n</i>)	стадии эмбрионального развития, часы		
		0–5½	5½–17	17–22		0–5½	5½–17	17–22
голодание – 12 часов								
<i>w_{C-S}</i>	474	2.1 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.2	81	1.2 ± 1.0	7.4 ± 4.6	0
<i>w_{Or}</i>	237	10.5 ± 3.9	4.6 ± 1.9	0.4 ± 0.2	52	5.8 ± 1.5	11.5 ± 19.6	0
<i>w_{C-S}^t</i>	701	1.6 ± 0.2	9.1 ± 1.2	0.8 ± 0.1	27	22.2 ± 6.6	0	0
<i>w_{Or}^t</i>	547	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.3	0.6 ± 0.1	137	1.5 ± 1.1	4.4 ± 3.1	0
<i>w_{C-S}^a</i>	582	4.3 ± 0.7	5.2 ± 0.8	0.3 ± 0.1	11	0	9.1 ± 5.1	0
<i>w_{Or}^a</i>	527	4.7 ± 0.8	3.9 ± 0.7	1.3 ± 0.2	164	3.0 ± 1.8	9.1 ± 6.5	0
<i>w_{C-S}^{sat}</i>	319	2.2 ± 0.6	0.6 ± 0.2	0	0	0	0	0
<i>w_{Or}^{sat}</i>	222	5.8 ± 2.4	2.7 ± 1.1	0	234	2.1 ± 0.9	0.4 ± 0.2	1.3 ± 0.5
<i>C-S</i>	387	0.3 ± 0.1	1.6 ± 0.4	0	8	12.5 ± 1.7	12.5 ± 1.7	0
<i>Or</i>	413	5.1 ± 1.2	6.5 ± 1.5	3.4 ± 0.8	385	11.7 ± 2.7	7.5 ± 1.8	1.8 ± 0.4

Таблица 2.2. Средние значения показателя яйцепродукции (количество отложенных яиц) у имаго разного возраста мутантных линий и дикого типа и стадии эмбриональной гибели при 32 часовом голодании

Генотип	Возраст							
	3-х дневные имаго				10-ти дневные имаго			
	кол-во яиц (<i>n</i>)	стадии эмбрионального развития, часы			кол-во яиц (<i>n</i>)	стадии эмбрионального развития, часы		
		0–5½	5½–17	17–22		0–5½	5½–17	17–22
Голодание – 32 часов								
<i>w_{C-S}</i>	312	2.2 ± 0.7	9.6 ± 2.7	2.6 ± 0.8	57	3.5 ± 0.9	26.3 ± 3.8	0
<i>w_{Or}</i>	124	3.2 ± 2.5	7.2 ± 5.4	0.8 ± 0.6	128	7.8 ± 5.6	28.9 ± 15.7	1.6 ± 1.2
<i>w_{C-S}^t</i>	340	0.9 ± 0.2	2.6 ± 0.7	2.9 ± 0.8	153	2.6 ± 1.6	36.6 ± 15.1	1.9 ± 1.2
<i>w_{Or}^t</i>	299	2.1 ± 0.6	6.7 ± 2.1	1.3 ± 0.4	291	1.7 ± 0.6	10.3 ± 3.1	1.4 ± 0.5
<i>w_{C-S}^a</i>	488	1.6 ± 0.3	1.8 ± 0.3	2.4 ± 0.4	45	4.4 ± 2.9	15.6 ± 29.8	0
<i>w_{Or}^a</i>	354	3.1 ± 0.8	5.6 ± 1.5	4.8 ± 1.3	181	3.7 ± 2.1	42.5 ± 13.5	1.7 ± 0.9
<i>w_{C-S}^{sat}</i>	489	0.8 ± 0.2	4.1 ± 0.8	0.4 ± 0.1	0	0	0	0
<i>w_{Or}^{sat}</i>	338	2.3 ± 0.6	5.0 ± 1.4	2.1 ± 0.6	330	3.03 ± 0.8	14.2 ± 3.7	0.3 ± 0.1
<i>C-S</i>	338	0.3 ± 0.1	4.1 ± 1.2	0.6 ± 0.2	45	0	15.6 ± 29.9	0
<i>Or</i>	217	2.3 ± 1.0	5.1 ± 2.2	5.9 ± 2.5	292	2.1 ± 0.6	14.9 ± 4.2	1.7 ± 0.5

Таблица 2.3. Средние значения показателя яйцепродукции (количество отложенных яиц) у имаго разного возраста мутантных линий и дикого типа и стадии эмбриональной гибели при 42 часовом голодании

Генотип	Возраст							
	3-х дневные имаго				10-ти дневные имаго			
	кол-во яиц (<i>n</i>)	стадии эмбрионального развития, часы			кол-во яиц (<i>n</i>)	стадии эмбрионального развития, часы		
		0–5½	5½–17	17–22		0–5½	5½–17	17–22
голодание – 42 часов								
<i>w_{C-S}</i>	109	2.7 ± 2.4	7.3 ± 6.2	4.6 ± 4.0	16	0	6.2 ± 0.6	6.3 ± 3.6
<i>w_{Or}</i>	21	0	4.7 ± 2.1	0	45	0	8.9 ± 1.9	0
<i>w_{C-S}^t</i>	0	0	0	0	20	25 ± 9.75	0	0
<i>w_{Or}^t</i>	42	11.9 ± 4.9	19.0 ± 6.6	0	206	0.5 ± 0.2	5.3 ± 2.4	0.9 ± 0.4
<i>w_{C-S}^a</i>	189	0	10.1 ± 4.7	0.5 ± 0.2	579	1.0 ± 0.2	19.3 ± 2.6	2.4 ± 0.4
<i>w_{Or}^a</i>	43	0	34.8 ± 5.9	2.3 ± 5.2	107	6.5 ± 5.7	66.3 ± 20.9	0
<i>w_{C-S}^{sat}</i>	19	0	0	5.23 ± 2.2	5	0	20 ± 3.3	0
<i>w_{Or}^{sat}</i>	10	0	30 ± 2.1	0	5	40 ± 4.0	0	0
<i>C-S</i>	12	33.3 ± 1.5	0	16.6 ± 1.4	214	3.7 ± 1.8	35.5 ± 10.6	0
<i>Or</i>	26	3.8 ± 1.4	0	0	120	1.7 ± 1.4	22.5 ± 14.5	0

бели на поздних стадиях (17–22 ч). У 10-ти дневных имаго после 42 часового голодания гибель эмбрионов возникала преимущественно на стадии гаструляции (5½–17 ч). У мутантных линий (*w_{Or}*, *w_{Or}^a*, *w_{Or}^{sat}*, *w_{C-S}^t*, *w_{C-S}^{sat}*) и дикого типа (*C-S* и *Or*) гибель эмбрионов не обнаруживалась на поздних стадиях развития (табл. 2.2, 2.3).

Данные таблиц 2.1, 2.2, 2.3 отражают общие тенденции влияния возраста и длительности голодания на изучаемые показатели: увеличение возраста снижает яйцепродукцию; увеличение длительности голодания снижает яйцепродукцию у 10-ти дневных имаго; увеличение возраста увеличивает наличие леталей 0–5½ и 5½–17 ч стадии эмбрионального развития, но снижает на стадии 17–22 ч; у 3-х дневных увеличение длительности голодания увеличивает количество леталей на стадии 5½–17 и 17–22 ч развития.

Изучение корреляционной связи между степенью пигментации глаз у 3-х и 10-ти дневных имаго дрозофил и яйцепродукцией показало для мутантных особей с генетическим фоном *C-S* наличие прямой зависимости ($r_s = 0,9$, $p < 0.05$).

Была установлена обратная зависимость между возрастом и яйцепродукцией, а также голоданием и яйцепродукцией ($r_s = 0.43$, $p < 0.05$; $r_s = 0.35$, $p < 0.05$ соответственно). Таким образом, способ-

ность к яйцепродукции зависит от возраста и сбалансированного питания.

Дисперсионный анализ факторов, влияющих на яйцепродукцию во всех возрастных группах имаго при различных режимах голодания, показал достоверное влияние практически всех факторов (табл. 3). Установлено влияние мутантных аллелей *w^t*, *w^a*, *w^{sat}* при голодании в течение 12 часов 3-х дневных имаго ($F = 13.45$; 6.22; 4, 91, соответственно). У 3-х дневных имаго при длительном голодании сила влияния мутантного аллеля увеличивалась. Так, при голодании 3-х дневных имаго в течение 42 часов влияние аллеля *w* составляло 16.21, а *w^a* – 54.54 ($p < 0.05$).

Для 10-ти дневных имаго при 12 часовом голодании наблюдается достоверное влияние всех мутантных аллелей, но разное по силе. Следует отметить, что также было обнаружено влияние генетического фона на яйцепродукцию, которое превышало во всех случаях значения влияния мутантного аллеля.

Известно, что длительное голодание приводит не только к нарушениям гаметогенеза, но и к появлению отклонений в развитии организма на эмбриональной стадии онтогенеза (Adler, 2013; Костенко, 2014). Поэтому, был проведен анализ ранних и поздних ДЛМ на стадии яйца. Для всех изучаемых мутантных линий по локусу *white*, ко-

Таблица 3. Оценка силы влияния генетической роли, возраста и голодания на яйцепродукцию, % рДЛМ, % пДЛМ

Фактор	Яйцепродукция		% рДЛМ		% пДЛМ	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
1 Аллель	20.603	0.000	1.416	0.228	2.607	0.035
2 Генетический фон (Г.Ф.)	0.841	0.359	0.226	0.635	0.026	0.872
3 Возраст	325.774	0.000	91.127	0.000	1.241	0.290
4 Голодание	165.104	0.000	5.619	0.004	1.600	0.203
Аллель + Г.Ф.	29.480	0.000	2.433	0.047	2.031	0.089
Аллель + Возраст	6.625	0.000	3.431	0.001	1.307	0.238
Г.Ф. + Возраст	71.242	0.000	0.522	0.593	2.517	0.082
Аллель + Голодание	7.513	0.000	1.572	0.131	1.650	0.109
Г.Ф. + Голодание	5.854	0.003	7.947	0.001	1.233	0.292
Возраст + Голодание	117.136	0.000	7.626	0.000	0.621	0.647
Аллель + Г.Ф. + Возраст	1.425	0.184	2.874	0.004	2.604	0.008
Аллель + Г.Ф. + Голодание	5.788	0.000	2.064	0.038	0.473	0.875
Аллель + Возраст + Голодание	13.915	0.000	2.514	0.001	1.115	0.338
Г.Ф. + Возраст + Голодание	27.299	0.000	2.025	0.090	1.077	0.367
1*2*3*4	7.456	0.000	2.016	0.011	2.307	0.003

торые находились на двух контрастных генетических фонах было показано, что у 3-х дневных особей M_{C-S} достоверно превышало значения рДЛМ по сравнению с особями M_{Or} , не зависимо от продолжительности голодания. У 10-ти дневных имаго была установлена обратная зависимость между влиянием генетического фона и рДЛМ. Следовательно, мутантные линии с генетическим фоном *Or* имели больший процент рДЛМ по сравнению с линиями M_{C-S} .

Анализ связи между степенью пигментации глаз и % пДЛМ у 3-х дневных мутантных имаго по локусу *white*, имеющие генетический фон линии *Or* показал обратную зависимость ($r_s = 0.9$, $p < 0.05$). Также была установлена прямая связь между возрастом и процентом поздних эмбриональных мутаций ($r_s = 0.35$, $p < 0.05$; $r_s = 0.15$, $p < 0.05$, соответственно). Корреляционный анализ показал обратную зависимость между голоданием и летальными мутациями на стадии яйца ($r_s = 0.07$, $p > 0.05$; $r_s = 0.11$, $p < 0.05$, соответственно).

Данные дисперсионного анализа влияния аллелей локуса *white* и генетического фона на процент летальных мутаций и эмбриональной гибели позволили установить, что для всех возрастных групп, независимо от продолжительности голодания, достоверно влияет генетический фон.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной целью нашего исследования являлось изучение стадий эмбриональной гибели *D. melanogaster* 3-х и 10-ти дневных мутантных ли-

ний и дикого типа с различной природой аллелей локуса *white* при действии стресс-индуцированного фактора — голодания. Известно, что ограничение калорий или голодание оказывают геропротекторное действие на организм (Piper, Partridge, 2007), задерживая процессы старения и развитие возрастзависимых заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, сахарного диабета II типа и другие (Crowther et al., 2006; Patel et al., 2005). Однако необходимо учитывать тот, факт, что в индивидуальном ответе организма на стресс-индуцированное действие существуют различия. Поэтому в нашей работе проводили исследование мутантных линий *white* (w^l), *white*^{tinged} (w^t), *white*^{apricot} (w^a) и *white*^{satsuma} (w^{sat}), которые отличались степенью пигментации глаз ($w^l < w^t < w^a < w^{sat}$). При этом линии были выровнены по генотипу (мутация переведена на генетический фон дикого типа *C-S* и *Or*).

Одной из важных особенностей влияния ограничения калорий или голодания на организм является снижение их репродуктивной способности. Это, возможно, связано с перераспределением энергетических ресурсов между соматическим поддержанием организма и репродукцией на фоне стресса. Кроме этого, голодание способствует изменению межклеточных связей между соматическими клетками и гаметами, что также нарушает репродуктивную функцию (Kaszmarczyk, Kopp, 2011). Яйцепродукция отражает репродуктивную способность организмов, поэтому, нами был проанализирован данный показатель у мутантных аллелей линий *white* и дикого типа. В работе показа-

но, что голодание снижает яйцепродукцию как у 3-х, так и у 10-ти дневных всех изучаемых линий *D. melanogaster*. Это совпадает с литературными данными (Piper, Partridge, 2007; Vermeulen, Loeschcke, 2007).

Важную роль в реализации адаптивных процессов в организме играет механизм активации мобильных генетических элементов, которые составляют около 10% генома дрозофилы. Возможно, одной из причин влияния аллелей локуса *white* на яйцепродукцию является наличие разных мобильных генетических элементов в аллелях. Известно, что мутация *white* возникла вследствие встраивания мобильного элемента *Doc* (подкласс non-LTR ретротранспозоны, группа LINE – long interspersed nuclear element), а мутация *w^a – copia* (подкласс LTR ретротранспозоны) (Васильева и др., 2011). Образование аллелей локуса *white* мобильными элементами, путем их достраивания в кодирующие и некодирующие регионы, в дистальные или центральные области – угнетая экспрессию гена *white*, что приводит к нарушению целого ряда биохимических процессов. Известно, что транспозиционная активность МГЭ является основным источником мутагенеза и играет существенную роль в регуляции мутабельности в природных популяциях дрозофил, особенно это касается семейств Р и *hobo* транспозонов, активность которых максимальна в условиях Р–М и Н–Е системах гибридного дисгенеза. Выбранные для насыщающих скрещиваний линии дикого типа *C-S* и *Or* являются контрастными по ряду признаков приспособленности: локомоторная активность, половое поведение, плодовитость, жизнеспособность. В работе Юраневой И.А. (Юранева, 2002) было показано, что линии *C-S* и *Or* различаются также по цитотипу, а именно, по типам МГЭ систем гибридного дисгенеза: *Oregon-R* – имеет *H* цитотип, содержит активные *hobo* элементы, *C-S* – имеет *I* цитотип, содержит *I* элементы. Это дает основание предположить возможное противоположное влияние на приспособленность организмов, содержащие различные типы МГЭ, что отражается в полученных нами результатах (табл. 1). По литературным данным у линии *C-S*, имеющей *I* фактор (LINE-подобный элемент дрозофилы), наблюдается реакция радиоадаптации, тогда как у *Or*, отличающейся наличием в геноме копии полноразмерного *hobo* элемента, этот эффект не наблюдается. Возможно, подобные механизмы реализуются при действии других стресс-факторов, например, голодании. Это может угнетать яйцепродукцию и увеличивать количество эмбриональных летальных мутаций.

Известно, что гаметогенез и эмбриогенез являются чувствительными к действию стресс-факторов и нарушаются при недостатке в организме питательных веществ (Drummond-Barbosa, Spradling, 2001; Костенко и др., 2014). Кроме того, с

увеличением возраста организма в гаметах изменяется частота кроссинговера, наблюдается апоптоз гамет и развитие генетических нарушений, что увеличивает эмбриональную смертность (Panagopoulos, 2012; Markow et al., 2009; Abrams et al., 1993).

В основном ДЛМ при голодании и старении возникает на стадии зиготы и, в первые часы после оплодотворения за счет анеуплоидии или крупных хромосомных перестроек (Adler et al., 2013). Так, в нашем исследовании было показано, что при кратковременном голодании у 3-х и 10-ти дневных имаго дрозофил гибель эмбрионов, в основном, происходит на ранних стадиях эмбриогенеза (0–5½ и 5½–17 ч), т. е. на стадии зиготы, бластулы и гастрюляции. Длительное голодание независимо от возраста вызывает гибель эмбрионов на всех стадиях эмбриогенеза. Возможно, это связано с тем, что голодание способствует активации механизмов, нарушающих процессы гисто- и органогенеза, нарушением экспрессии генов семейства *Vitellogenin*, ответственных за синтез основного белка эмбрионов дрозофилы вителлогенина (Ren, Hughes, 2014; Bouter et al., 2010). Кроме того, увеличение гибели эмбрионов, возможно, связано, с накоплением в организме исследуемых линий дрозофил, которые отличаются аллелями локуса *white*, токсических метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана, а именно – 3-гидроксикинуренина. Этот метаболит индуцирует в организме генерацию активных форм кислорода и вызывают окислительный стресс, что способствует увеличению гибели эмбрионов в разные периоды развития (Костенко, Воробьева, 2012).

Данное исследование показывает, что трудно выделить эффекты накопления летальных мутаций, связанные с возрастом и действием стресс-фактора (голодания). Тем не менее, оно отражает увеличение гибели эмбрионов на более поздних стадиях развития независимо от возраста насекомых, что, возможно связано либо с накоплением активных форм кислорода, либо токсических метаболитов, либо с изменением экспрессией генов, участвующих в развитии на ранних стадиях эмбриогенеза. Это, в свою очередь, индуцирует нарушения сегментации эмбриона, формирования органов дыхания, кишечника (нарушение расщепления желтка в организме эмбриона), ротового аппарата (отсутствие ротовых крючков не позволяет прободать вителлиновую мембрану) и т.д.

Таким образом, сокращение яйцепродукции является эволюционно консервативной адаптивной компенсаторной реакцией организма на действие стресс-факторов, направленной на выживание организма. Установлено, что у 3-х дневных имаго эмбриональная гибель преимущественно происходит на ранних эмбриональных стадиях, а у 10-ти дневных – в середине эмбрионального пе-

риода онтогенеза и имеет генетические вариации в зависимости от линии *D. melanogaster*. Голодание сопровождается снижением яйцепродукции и повышением эмбриональной летальности, особенно у 10-ти дневных имаго, при этом преобладают стадии, на которых осуществляется гисто- и органогенез (5½–17 ч). Экспериментальные данные показали наличие корреляции между возрастом имаго, их голоданием и стадиями эмбриональной гибели. Причины и механизмы, лежащие в основе влияния голодания и возраста на развитие ранних и поздних стадий эмбриональной гибели, остаются пока до конца не выясненными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bashirullah A., Cooperstock R.L., Lipshitz H.D.* RNA localization in development (review) // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 335–394.
- Panagopoulos D.J.* Gametogenesis, embryonic and postembryonic development of *Drosophila melanogaster*, as a model system for the assessment of radiation and environmental genotoxicity // *Drosophila melanogaster: Life Cycle, Genetics*. 2012. P. 1–38.
- Giorgi F., Deri P.* Cell death in ovarian chambers of *Drosophila melanogaster* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1976. V. 35. P. 521–533.
- Drummond-Barbosa D., Spradling A.C.* Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis // *Dev. Biol.* 2001. V. 231. P. 265–278.
- Markow T.A., Beall S., Matzki L.M.* Egg size, embryonic development time and ovoviviparity in *Drosophila* species // *J. Evol. Biol.* 2009. V. 22. P. 430–434.
- Abrams J.M., White K., Fessler L.I. et al.* Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis // *Development*. 1993. V. 17. P. 29–43.
- Hetzer M., Gruss O.J., Mattaj W.* The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly (review) // *Nature Cell Biol.* 2002. V. 4. P. 177–184.
- Ivanovic J.P., Jankovic-Hladni M.* Hormones and metabolism in insect stress // CRC Press, Boca Raton. 1991. P. 149–164.
- Neckameyer W., Weinstein J.* Stress affects dopaminergic signaling pathways in *Drosophila melanogaster* // *Stress*. 2005. V. 8. P. 117–132.
- Adler M.I., Cassidy E.J., Fricke C. et al.* The lifespan reproduction tradeoff under dietary restriction is sex specific and context dependent // *Experimental Gerontology*. 2013. V. 48. P. 539–548.
- Костенко В.В., Колот Н.В., Воробйова Л.И.* Вплив віку та голодування на яйцепродукцію имаго *Drosophila melanogaster* та порушення ембріонального етапу онтогенезу // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2014. Вип. 66. С. 64–70. (Kostenko V.V., Kolot N.V., Vorobyov L.I. The influence aging and starvation of imago *Drosophila melanogaster* on egg production and deviations of embryonic development // *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*. 2014. Issue 66. P. 64–70)
- Костенко В.В., Воробйова Л.И.* Влияние аллелей локуса *white* и генетического фона на локомоторную активность имаго *Drosophila melanogaster* // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. Серия: биология. 2012. Вып. 16. № 1035. С. 90–96. (Kostenko V.V., Vorobyov L.I. The influence of allele of locus *white* and genetic background on locomotor activity imago *Drosophila melanogaster* // *Visnyk of V.N. Karazin Kharkov National University. Series Biology*. 2012. Issue 16. № 1035. P. 90–96.)
- Тихомирова М.М.* Генетический анализ. Л.: Издательство ЛГУ, 1990. 280 с. (Tichomirova M.M. The genetic analysis. L.: Publishing LSU, 1990. 280 p.)
- Hill D.L.* Chemical removal of the chorion from *Drosophila* eggs // *Drosophila Information Service*. 1945. V. 19. P. 62.
- Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с. (Lakin G.F. Biometrics. M.: Higher School, 1990. 352 p.)
- Piper M.D.V., Partridge L.* Dietary restriction in *Drosophila*: delayed aging or experimental artefact? // *Genetics*. 2007. V. 3. Issue 7. P. 0461–0466.
- Crowther D.C., Page R., Chandraratna D. et al.* A *Drosophila* model of Alzheimer's disease // *Methods Enzymol.* 2006. V. 412. P. 234–255.
- Patel N.V., Gordon M.N., Connor K.E. et al.* Caloric restriction attenuates a beta deposition in Alzheimer transgenic models // *Neurobiol Aging*. 2005. V. 26. P. 995–1000.
- Kaczmarczyk A.N., Kopp A.* Germline stem cell maintenance as a proximate mechanism of life history tradeoffs? // *Bioessays*. 2011. V. 33. P. 5–12.
- Vermeulen C.J., Loeschke V.* Longevity and the stress response in *Drosophila* // *Exp. Gerontol.* 2007. V. 42. № 3. P. 153–159.
- Васильева Л.А., Антоненко О.В., Захаров И.К.* Роль мобильных генетических элементов в геноме *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 14. № 2. С. 225–260. (Vasilyeva L.A., Antonenko O.V., Zakharov I.K. The role of mobile genetic elements in the genome of *Drosophila melanogaster* // *Vavilov J. of Genetics and Breeding*. 2011. V.14. № 2. P. 225–260.)
- Юранева И.А.* Действие хронического гамма-излучения на частоту доминантных летальных мутаций в популяциях экспериментальных линий *Drosophila melanogaster* // Вестник Института биологии КомиНЦУрО РАН. 2002. Вып. 60. С. 24–28. (Yuraneva I.A. Action chronic gamma radiation on the frequency of dominant lethal mutations in populations of experimental lines *Drosophila melanogaster* // *Bulletin of the Institute of Biology RAS KomiNTsUrO*. 2002. V. 60. P. 24–28.)
- Ren Y., Hughes R.A.* *Vitellogenin* family gene expression does not increase *Drosophila* lifespan or fecundity // *F1000Res*. 2014. V. 10. № 3. P. 125.
- Bouter A., Buisine N., leGrand A. et al.* Control of *vitellogenin* gene sex pression by sequences derived from transposable elements in rainbowtrout // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1799. P. 546–554.

Research of Embryonic Mortality Stages of *Drosophila melanogaster* Depending on Age and Starvation of an Imago

V. V. Kostenko, N. V. Kolot, and L. I. Vorobyova

Karazin Kharkiv National University, pl. Svobody 4, Kharkiv, 61022 Ukraine

e-mail: kostenkoviktoria88@rambler.ru

Received February 2, 2015; in final form, April 15, 2015

Influence of age of parents and duration of starvation on egg production and demonstration of embryonic mortality at different stages of egg development has been studied. It is shown that, with increasing age of organisms, the overall egg production reduces and the percentage of embryonic mortality increases at 0–5.5 and 5.5–17 h of development. An increase in the duration of starvation also promotes a reduction in egg production in 3- and 10-day-old adult *D. melanogaster* compared with short-term starvation. A statistically significant effect of factors, such as the allelic state of the *white* locus, the genetic background, the age of the parents, and the duration of starvation, on all studied parameters was established.

Keywords: *D. melanogaster*, *white* locus alleles, aging, starvation, embryonic mortality