

УДК 577.222.78:591.3:595.773.4:631.527.5

© 2002 г. С. М. САМИЛО, В. Г. ШАХБАЗОВ

ПРОЯВЛЕНИЕ ЭФФЕКТА ГЕТЕРОЗИСА У МЕЖЛИНЕЙНЫХ ГИБРИДОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER* MG. (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) В РЕАКЦИИ НА ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР

Исследование явления гетерозиса, как важного фактора генетического гомеостаза популяций, имеет большое значение для понимания генетических процессов происходящих в них (Lerner, 1954). Изучение параметров гибридных и инбредных организмов – далеко не новая научная проблема. Но несмотря на несомненные достижения в изучении явления гетерозиса, по мнению многих исследователей, феномен гибридной силы остаётся пока явлением, окруженным ореолом тайны. Высказывается мнение, что явление гетерозиса и механизмы, лежащие в его основе имеют непосредственное отношение к вопросу о сущности жизни (Шахбазов, Чешко, Шерешевская, 1990; Шахбазов, 1992). В связи с развиваемыми на кафедре генетики и цитологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина представлениями о цитобиофизических механизмах гетерозиса (Shakhbasov, 1973) и роли температуры в функционировании клеточного ядра, в которой особое внимание акцентируется на аспектах динамичности и негэнтропийности биологических процессов, связанных с глубокими и пока мало изученными функциями ядерного генома (Шахбазов, 1966а, 1966б, 1989; Шахбазов, Гринёв, Денисов, 1996), нам представилось перспективным изучить реакции высокоинбредных селективируемых линий и межлинейных гибридов F₁ на действие повышенной и пониженной температур. Ранее была обнаружена повышенная теплоустойчивость гетерозисных клеток, тканей и организмов в сравнении с исходными инбредными формами (Шахбазов, 1966а, 1966б, 1975). При изучении теплоустойчивости у линий и гибридов дрозофилы установлено, что смертность у чистотельных мух после высокотемпературной (41°C, 20 минут) обработки на 12–25 % выше, чем у межлинейных гибридов (Чепель, Алексеев, 1971; Хасан, Григорьева, Шахбазов, 1978). Показано, что повышенная теплоустойчивость гибридных организмов коррелирует с их более высокой устойчивостью к действию других физических факторов, а также с меньшей восприимчивостью гибридов к болезням, что позволяет метод термотеста и показатель теплоустойчивости использовать для оценки неспецифической устойчивости организмов (Шахбазов, 1966а, 1966б, 1972, 1975). В то же время, в отношении реакции инбредных и гибридных организмов на действие низких температур литературные данные оказались более противоречивыми. Так, имаго межлинейных гибридов дрозофилы, а также межлинейные гибриды мышей не превосходят по холодоустойчивости родительские формы (Шахбазов, Данилина, 1973). В другой работе (Fontdesila, 1970) было отмечено, что при температуре – 2°C выживаемость гибридных особей дрозофилы выше, чем родительских форм на 23–38 %.

В связи с вышеприведенными фактами и развиваемыми новыми представлениями о роли температуры в функционировании клеточного ядра (Шахбазов, 1989), целью представленной работы было изучение неспецифической устойчивости высокоинбредных линий и межлинейных гибридов по уровню теплоустойчивости и по времени восстановления двигательных и ориентационных реакций имаго дрозофилы после кратковременного холодового воздействия. Особо следует подчеркнуть, что в данной работе изучалась не холодоустойчивость, как таковая (то есть устойчивость организма к повреждающему действию низких температур), а реактивность организма (как системы) по восстановлению функционирования после кратковременного (неповреждающего) воздействия субоптимальной температуры.

Объекты и методы исследований. Объектом исследования служили высокоинбредные селективируемые линии НА (низкоактивная) и ВА (высокоактивная). К началу опытов линии прошли 680 поколений инбридинга в сочетании с разнонаправленным отбором по половой активности самцов (Кайданов, Лосина, 1972; Кайданов 1979). Было показано, что отбор и инбридинг затронули целый комплекс адаптивно важных признаков. Линия ВА превосходит линию НА по плодовитости, скорости развития, жизнеспособности, конкурентоспособности и другим показателям. Установлено также, что линии ВА и НА обладают высокой комбинационной способностью к гетерозису. Гибриды между этими линиями значительно превосходят родительские инбредные формы по перечисленным адаптивно важным признакам (Кайданов, Субботин, 1984; Страшнюк, Таглина, Шахбазов, 1991; Samilo, Strashnyuk, Shakhbasov, 1997).

В связи с затрагиваемым в данной статье вопросом о малоизученных функциях генома, следует отметить, что разнонаправленный отбор по половой активности самцов, приведший к созданию

низкоадаптивной и высокоадаптивной линий дрозофилы, на геномном уровне выразился в изменении числа копий и рисунка локализации мобильных элементов. Причем высокоадаптивность в данном случае положительно коррелирует с увеличением числа копий МДГ по геному, а низкоадаптивность, наоборот, сопровождается уменьшением их числа (Согласованные ..., 1985). Не менее интригующе звучат выводы о том, что в линии НА могут происходить внезапные спонтанные транспозиции мобильных элементов, сопряженные с резким увеличением приспособляемости и адаптивной ценности. Следует отметить, что по данным литературы, так называемые «транспозиционные взрывы», по всей видимости, не являются артефактом (Роль новых ..., 1989), а несут какую-то непонятную пока нам функциональную нагрузку.

В нашем исследовании линии и гибриды дрозофилы развивались в стандартной сахарно-дрожжевой среде при температуре 24–25°C.

Теплоустойчивость изучали при помощи метода термотеста, разработанного на кафедре генетики и цитологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина (Шахбазов, 1966а, 1966б, 1975) как метод прогнозирования эффекта гетерозиса и неспецифической устойчивости растений и животных. Впоследствии термотест был успешно применен и для оценки неспецифической устойчивости на дрозофиле (Чепель, Алексеев, 1971). Особенность метода состоит в том, что объекты подвергаются короткому, точно дозированному тепловому удару. Такая методика исключает эффект привыкания и позволяет непосредственно судить об устойчивости организмов к действию высокой температуры и их способности к репарации теплового повреждения. Для дрозофилы термотестирование проводили при температуре 41°C и экспозиции 20 минут. Имаго дрозофилы подвергались прогреву в стеклянных пробирках, погруженных в водный термостат. В пробирки помещали по 50 мух в возрасте до 1 суток, самок и самцов отдельно. Сразу после прогрева пробирки помещали в холодную воду, чтобы остановить действие высокой температуры, и термостатировали при 24°C. Учёт выживших особей проводили через 18 часов. Показателем теплоустойчивости служил процент особей, выживших после прогрева.

Метод оценки времени восстановления двигательных и ориентационных реакций имаго линий и гибридов дрозофилы после кратковременного холодового воздействия используется для оценки уровня неспецифической устойчивости организма и её зависимости от генотипа. В основу метода были положены новые представления о роли температуры в функционировании клеточного ядра (Шахбазов, 1966а, 1966б, 1989; Шахбазов, Гринёв, Денисов, 1996). Сущность метода заключается в том, что имаго линий и гибридов дрозофилы в стеклянных пробирках помещают в водный термостат при температуре 0°C на 3 минуты. В результате мухи впадают в состояние холодового оцепенения. После прекращения холодового воздействия мух переносят в условия температуры 25°C и фиксируют время, за которое имаго дрозофилы выходят из состояния холодового оцепенения. При указанных температуре и экспозиции все особи выживают.

С целью выяснения возможных механизмов реакций на температурные воздействия изучали изменения биоэлектрических свойств клеточных ядер. Имеющиеся данные позволяют рассматривать биоэлектрические свойства ядер как интегральный показатель их общего функционального состояния, уровня генетической активности и гомеостаза клеток (Шахбазов, Лобынцева, 1971). Исследовали электрокинетические свойства клеточных ядер в клетках слюнных желез личинок методом внутриклеточного микроэлектрофореза (Samilo, Strashnyuk, Shakhbasov, 1997). Для опытов отбирали личинок в конце III возраста. Слюнные железы извлекали на стекле электрофоретической камеры в капле раствора Эфрусси-Бидла. Напряженность электрического поля между электродами камеры составляла 7 В/см, сила тока в камере – 0,7 мА. При пропускании импульсов тока через среду, в которой находились железы, наблюдали смещение части ядер в сторону анода. Определяли процентную долю электроотрицательных ядер в контроле и после действия температуры.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования теплоустойчивости имаго дрозофилы представлены в табл. 1.

Таблица 1. Термотестирование имаго линий и гибридов дрозофилы

Генотипы	Доля выживших особей через 18 часов после прогрева, %	
	♀♀	♂♂
ВА	42,60±3,77	42,60±4,75
НА	25,00±2,77	19,80±2,84
ВА×НА	56,60±3,68	48,60±3,35
НА×НА	61,20±3,91	54,40±4,65

Полученные данные свидетельствуют о том, что разнонаправленный отбор привёл к существенным различиям по теплоустойчивости. Линия ВА характеризовалась более высоким уровнем теплоустойчивости, по сравнению с линией НА. Так, самки линии ВА на 70,4 % (P>0,99) превосходили по этому показателю самок линии НА, а самцы – на 120,2 % (P>0,999). Полученные данные подтверждают обнаруженное ранее наличие положительной корреляции между адаптивной ценностью различных генотипов и уровнем их теплоустойчивости. Прямой и обратный гибриды, за исключением самцов ВА×НА, достоверно превосходили обе родительские формы по изучаемому показателю, что можно объяснить проявлением у данных гибридов адаптивного гетерозиса. Достоверных различий между

полами по исследуемому показателю не обнаружено, за исключением гибрида ВА×НА, где у самок отмечалась тенденция к превосходству по уровню теплоустойчивости над самцами.

Результаты исследования влияния различных температур на электрокинетические свойства клеточных ядер личинок линий и гибридов дрозофилы представлены в табл. 2.

Таблица 2. Доля электроотрицательных ядер (в %) клеток слюнных желез личинок линий и гибридов дрозофилы в контроле и после действия высокой температуры

Генотип	в контроле	после 20-минутного воздействия 37°С	по отношению к контролю, %	после 20-минутного воздействия 39°С	по отношению к контролю, %
ВА	46,3±2,0	26,6±2,8	57,45	17,8±2,4	38,45
НА	34,9±1,8	18,4±2,6	52,72	10,3±2,2	29,51
ВА×НА	56,8±2,2	35,9±3,1	63,20	27,7±3,7	48,77
НА×ВА	59,0±2,1	39,6±3,4	67,12	29,0±3,4	49,15

Сравнительный анализ полученных данных показал, что взятые в эксперимент контрастные по адаптивно важным признакам линии дрозофилы достоверно отличались по доле электроотрицательных клеточных ядер. Более жизнеспособная линия ВА превосходила по данному показателю линию НА в среднем на 32,7 % ($P>0,99$), а гибриды F_1 превосходили исходные высокоинбредные линии. Различия составили в среднем по сравнению с линией ВА – 25,1 % ($P>0,99$), а с линией НА – 65,9 % ($P>0,999$). Реципрокного эффекта по изученному показателю не обнаружено. Следует отметить, что оба изученные температурные воздействия приводили к снижению доли электроотрицательных клеточных ядер. Сравнительный анализ полученных результатов показал, что взятые в эксперимент линии, которые отличались по адаптивно важным признакам, отличались и по величине, на которую изменялась доля электроотрицательных клеточных ядер под влиянием повышенной температуры. У линии ВА этот показатель уменьшался под влиянием температуры 37 С на 42,6 % ($P>0,999$), тогда как в линии НА – на 47,3 % ($P>0,999$). Ещё более выраженные генетические отличия в изменении доли электроотрицательных клеточных ядер между этими линиями наблюдались при действии температуры 39 С. Так в линии ВА этот показатель уменьшался на 61,6 % ($P>0,999$), тогда как в линии НА – на 70,5 % ($P>0,999$). Гибриды F_1 характеризовались более высоким уровнем биоэлектрического гомеостаза, так как по сравнению с инбредными линиями доля электроотрицательных клеточных ядер под влиянием обеих температур у них снижался на меньшую величину. Под влиянием температуры 37 С этот показатель у гибрида ВА×НА уменьшался на 36,8 % ($P>0,99$), а у гибрида НА×ВА – на 32,9 % ($P>0,99$). Под влиянием температуры 39°С у гибрида ВА×НА уменьшался на 51,2 % ($P>0,999$), а у гибрида НА×ВА – на 50,9 % ($P>0,999$).

Результаты исследования генетических различий по времени восстановления двигательных реакций после кратковременного холододового воздействия представлены в табл. 3.

Таблица 3. Время восстановления двигательных реакций (в сек) у имаго линий и гибридов дрозофилы после кратковременного холододового воздействия

Генотипы	♀♀	♂♂
ВА	46,80±5,41	43,80±3,52
НА	52,60±5,26	48,80±3,61
ВА×НА	34,30±1,48	34,80±1,58
НА×ВА	40,30±2,85	34,00±1,29

Полученные данные свидетельствуют о том, что у линии ВА наблюдается тенденция к уменьшению времени восстановления двигательной активности после кратковременного холододового воздействия по сравнению с линией НА. Хотя достоверной разницы получено не было. Гибриды F_1 достоверно отличались от обеих инбредных форм по изучаемому показателю. Так, самки гибрида НА×ВА характеризовались меньшим временем восстановления двигательной активности по сравнению с самками НА на 30,5 % ($P>0,96$), а в сравнении с самками ВА достоверной разницы не обнаружено. Самцы гибрида НА×ВА быстрее выходили из состояния холододового оцепенения по сравнению с самцами ВА на 28,8 % ($P>0,99$) и на 43,5 % ($P>0,999$) – по сравнению с самцами НА. Самцы ВА×НА быстрее выходили из состояния холододового оцепенения на 25,9 ($P>0,98$) по сравнению с самцами ВА и на 40,2 % ($P>0,99$) – по сравнению с самцами НА. Достоверных отличий по изучаемому показателю между полами не обнаружено. Зафиксирована тенденция у гибрида НА×ВА к превосходству самцов над самками по скорости выхода из холододового оцепенения.

Результаты исследования влияния низкой температуры (0°С, 10 минут) на электрокинетические свойства клеточных ядер личинок линий и гибридов дрозофилы представлены в табл. 4.

При холододовом воздействии снижение доли электроотрицательных клеточных ядер менее выражено, чем при действии высокой температуры. Так после 10-минутного воздействия 0°С этот показатель у линии НА уменьшался на 16,0 % ($P>0,97$), а у линии ВА – на 16,9 % ($P>0,98$). У обеих гибридных форм достоверного снижения доли электроотрицательных клеточных ядер вовсе не отмечено.

По всей видимости, при данной экспозиции и температуре не происходит существенных повреждений ядерных структур, в отличие от действия повышенных температур.

Т а б л и ц а 4. Доля электроотрицательных ядер (в %) клеток слюнных желез личинок линий и гибридов дрозофилы в контроле и после действия низкой температуры

Генотип	в контроле	после 10-минутного воздействия 0°C	по отношению к контролю, %
ВА	46,3±2,0	38,5±1,8	83,15
НА	34,9±1,8	29,3±1,5	83,95
ВА×НА	56,8±2,2	55,4±2,1	97,54
НА×ВА	59,0±2,1	58,0±2,4	98,31

В ы в о д ы. Таким образом, эффект гетерозиса, зафиксированный у данной гибридной комбинации по уровню неспецифической устойчивости и биоэлектрическим свойствам клеточных ядер, проявляется и во времени восстановления двигательной активности после кратковременного холодового воздействия. На системном уровне, в соответствии с опубликованными ранее представлениями одного из авторов о том, что структуры клеточного ядра являются биологическими преобразователями тепловой энергии и микроскопическими квантовыми генераторами электромагнитных колебаний, которые образуют в клетке электромагнитные поля и токи ионов и электронов (Шахбазов, 1966а, 1966б), по всей видимости, причины генетических различий по времени восстановления двигательных реакций нужно искать в различиях структурно-энергетической организации ядерных аппаратов инбредных линий и гетерозисных гибридов. Существование энергетической разнокачественности ядерных аппаратов гетерозисных гибридов и инбредов подтверждает и обнаруженный нами факт различий в количестве электроотрицательных клеточных ядер и термолабильности этого показателя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кайданов Л. З. Анализ генетических последствий отбора и инбридинга у *Dr. melanogaster* // Ж. общ. биол. – 1979. – Т. 40, № 6. – С. 834–843.
- Кайданов Л. З., Лосина М. Б. Исследование генетики полового поведения *Dr. melanogaster* // Генетика. – 1972. – Т. 8. – С. 84.
- Кайданов Л. З., Субботин А. М. Исследование комбинационной способности инбредных линий *Dr. melanogaster*, различающихся по адаптивной ценности // Цитология и генетика. – 1984. – Т. 18, № 6. – С. 429–433.
- Котенко Л. В., Шахбазов В. Г. Особенности теплоустойчивости линейных мух *Dr. melanogaster* в связи с гетерозисом у гибридов // Генетика. – 1984. – Т. 20, № 6. – С. 984–988.
- Роль новых мобильных элементов в транспозиционных взрывах / Л. А. Оболенкова, С. Л. Киселёв, Н. А. Чуриков, Т. И. Герасимова // VI Всесоюз. совещ. по проблемам биологии и генетики дрозофилы: Тез. докл. – Одесса, 1989. – С. 56–57.
- Согласованные изменения локализации мобильных элементов в геноме *Dr. melanogaster*, отражающие результат направленного отбора по количественным признакам // Е. А. Пасюкова, Г. П. Коган, О. В. Иовлева и др. // Докл. АН СССР. – 1985. – Т. 283, № 6. – С.
- Страшнюк В. Ю., Таглина О. В., Шахбазов В. Г. Эдизонзависимые изменения активности пуфов онтогенеза в слюнных железах дрозофилы, культивируемых *in vitro*, в связи с эффектом гетерозиса и отбором по адаптивно важным признакам // Генетика. – 1991. – Т. 27, № 9. – С. 1512–1518.
- Хасан А. М., Григорьева Н. Н., Шахбазов В. Г. О вкладе X-хромосомы в повышение устойчивости межлинейных гибридов *Drosophila melanogaster* к некоторым физическим воздействиям // Генетика. – 1978. – Т. 14, № 1. – С. 87–92.
- Чепель Л. М., Алексеев В. М. Сравнительное изучение теплоустойчивости инбредных линий и гибридов шелкопрядов и дрозофилы // Устойчивость к экстремальным температурам и температурные адаптации. – Х., 1971. – С. 58–61.
- Шахбазов В. Г. Гетерозис и теплоустойчивость // Бюл. Моск. о-ва испыт. природы. Отд. биол. – 1966а. – Т. 71, № 6. – С. 120–127.
- Шахбазов В. Г. Нова генетична гіпотеза на основі біофізичних дослідів // Організм як система. – К.: Наукова думка, 1966б. – С. 98–107.
- Шахбазов В. Г. Гетерозис – явление общебиологическое. – М.: Знание, 1972. – 32 с.
- Шахбазов В. Г. Прогнозирование эффекта гетерозиса семян с.-х. растений методом термотестирования // Гетерозис с.-х. растений, его физиолого-биохимические и биофизические основы. – М., 1975. – С. 224–229.
- Шахбазов В. Г. Новое представление о роли температуры в формировании биоэлектрического потенциала и генетических функций клеточного ядра // Докл. АН СССР. – 1989. – Т. 308, № 4. – С. 994–997.
- Шахбазов В. Г. Механизмы формирования и проявления гетерозиса // Природа, проявление и прогнозирование гетерозиса. – К.: Наукова думка, 1992. – С. 5–15.
- Шахбазов В. Г., Гринёв Д. В., Денисов С. В. Биоэлектрические свойства клеточных ядер, температура и динамика молекулы ДНК // Доп. НАН України. – 1996. – № 4. – С. 143–146.
- Шахбазов В. Г., Данилина В. В. Гетерозис и холодоустойчивость // Цитология и генетика. – 1973. – Т. 7, № 4. – С. 356–360.
- Шахбазов В. Г., Лобынцева Г. С. Биоэлектрические свойства ядра и ядрышка в клетках растений в связи с генотипом физиологическим состоянием и действием высокой температуры // Биофизика. – 1971. – Т. XVI, вып. 3. – С. 457–461.
- Шахбазов В. Г., Чешко В. Ф., Шерешевская Ц. М. Механизмы гетерозиса: история и современное состояние проблемы. – Х.: Основа, 1990. – 120 с.
- Шкорбатов Ю. Г., Шахбазов В. Г. Биоэлектрические свойства клеточных ядер // Успехи соврем. биологии. – 1992. – Т. 112, вып. 4. – С. 499–511.
- Fontdesila A. Genotype temperature interaction in *D. melanogaster* I. Viability // Genetica. – 1970. – Vol. 41, № 2. – P. 257–264.
- Lerner I. M. Genetic homeostasis. – New York: Willey and sons, 1954. – 134 pp.
- Samilo S. M., Strashnyuk V. Yu., Shakhbasov V. G. Genetic aspects of fitness in relationship with the bioelectric properties of cell nuclei and functions of chromosomes in *Drosophila melanogaster* Meig. // School of Fundamental Medicine Journal. – 1997. – Vol. 3. – P. 2.
- Shakhbasov V. G. Eukaryotic gene activities in connection with homologous chromosome interaction and bioelectrical properties of the cell nucleus. – Genetics. – 1973. – Vol. 74, № 2, part 2. – P. 249–250.

UDC 577.222.78:591.3:595.773.4:631.527.5

S. M. SAMILO, V. G. SHAKHBAZOV

**THE EXPRESSION OF HETEROTIC EFFECT ON INTERLINES
CROSSES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* MG. (DIPTERA:
DROSOPHILIDAE) UNDER EXTREME TEMPERATURE**

Kharkov National University

SUMMARY

The reactions of high-inbred selected lines and inter-line hybrid of *Drosophila melanogaster* Mg. to extreme temperatures have been subjected to a comparative study at organism and cell levels. The heat resistance of the imago, the electronegativity of cell nuclei in larval salivary glands, and thermolability of the latter parameter in lines with marginal adaptive characters have been determined and found to be different. It was established that the higher-adaptivity line has higher values of these parameters than the lower-adaptivity line, and that F₁ hybrids have higher values than both parents. The hybrids were also observed to have shorter average recovery period from cold stress than the high-inbred lines. On the basis of both our experimental data and evidences of other studies, it is concluded that the observed differences between hybrids and inbreeds may be explained by certain heterogeneities in their nuclear structure and energetics.

4 tabs, 24 refs.