methylated on endonucleases *Hpa*II/*Msp*I restriction sites in green leafs of Nu 21/5 and Nu 21/6 line transgenic plants.

МИРОСЬ Е. Л.[1]**, КОЗЕРЕЦКАЯ И. А.**[2]**, АНДРИЕВСКИЙ А. М.**[1]
[1]*Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,*
Украина, 65026, Одесса, ул. Дворянская, 2, e-mail: www.mel1982@mail.ru
[2]*Киевский национальный университет имени Т. Г. Шевченко,*
Украина, 01033, Киев, ул. Владимирская, 64

ПОЛИМОРФИЗМ И ЭКСПРЕССИЯ КАРБОКСИЭСТЕРАЗ У САМЦОВ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ

В природных условиях живые организмы подвергаются комплексному влиянию факторов окружающей среды физической и химической природы, которые в сочетании с радиацией могут приводить к новым неожиданным биологическим эффектам. [1].

Как отмечается в ряде работ [2, 3], многие протеолитические и эстеролитические ферменты, выполняя в организме важную роль поддержания физиологического баланса свободных и связанных органических кислот, могут демонстрировать адаптационные возможности организма [4]. К сожалению, показатели фенотипического фенотипа у отдельных видов организмов, обитающих в экстремальных условиях, практически не изучены. В связи с этим, данная экспериментальная работа проводилась с целью исследовать полиморфизм и экспрессию основных ферментов карбоксиэстеразной системы у дрозофил взятых из регионов, характеризующихся разным уровнем радиации в зоне отчуждения [5]. В задачи даного исследования входило изучить экспрессию карбоксиэстераз у самцов *Drosophila melanogaster* Чернобыльской зоны отчуждения.

Материалы и методы

Материалом исследований служили линии дикого типа *Drosophila melanogaster,* которые были отобраны из природных популяций Чернобыльской зоны отчуждения: *Чернобыльская 1* (г. Чернобыль; уровень радиации *50 мкр/ч*), *Чернобыльская 2* (г. Полесское; уровень радиации *50 мкр/ч*), *Чернобыльская 3* (водоём-охладитель ЧАЭС; уровень радиации *2 100мкр/ч*). В качестве объекта сравнения использовали лабораторную линию дикого типа *Одесская 1* (г. Одесса; уровень радиации соответствует норме).

Линии разводили и поддерживали при одинаковых условиях: в темноте при постоянной температуре 25 ^{o}C на стандартной питательной среде [6].

Для определения ферментативной экспрессии карбоксиэстераз [7] готовили экстракты тканей отдельно взятых самцов имаго (предварительно наркотизированных диэтиловым эфиром) в 10 *мкл* 0,1 *М* глицин-*NaOH* буфера *pH* 9,0 с 1 *%* тритона *X*-100. Гомогенаты тканей центрифугировали на холоде при 10 000 *g* в течение 15 *мин*, после чего надосадочные жидкости отбирали и смешивали с 5 *мкл* 0,01 *%* раствора бромфенолового синего, приготовленного на 60 *%* растворе сахарозы. Полученные ферментсодержащие экстракты подвергали щелочному электрофорезу в 10 *%* полиакриламидном геле. После электрофоретического разделения гелевые блоки с локализованными в них ферментами отмывали в дистиллированной воде и выдерживали 10 *мин* в нейтральном буфере. Далее гелевые пластины инкубировали 20 *мин* при 25 °*C* в 25 *мл* 0,1 *М* трис-глицинового буфера *pH* 7,4, содержащего по 12 *мг* α- и β-нафтилацетатов и 25 *мг* соли диазония — прочного синего. Реакцию ферментативного расщепления субстратов

останавливали заливкой гелей кипящей дистиллированной водой. Отмытые пластины гелей сканировали во влажном состоянии при высокой степени разрешения (300 *dpi*), а их цифровые изображения сохраняли в формате *BMP*. Созданные сканограммы денситометрировали с помощью специальной компьютерной программы «АнаИС» (Поджарский М. А., Рыбалка Д. Г., 2004 г.). Полученные данные по оптической плотности *(*Δ*Do,* относительные единицы) для каждой фракции карбоксиэстераз использовали для нахождения среднего значения — $\Delta\overline{Do}$ и стандартной ошибки – *m*. Достоверность наблюдаемых различий в активности карбоксиэстераз оценивали с помощью критерия Стьюдента [8]. Статистическую обработку первичных данных осуществляли с помощью компьютерной программы *"Excel"*.

Результаты и обсуждение

Из приведенных на рис. 1 электрофореграмм видно, что самцы всех изучаемых популяций характеризуются наличием карбоксиэстераз, представленных 2 – 4 изоформами ферментов отличающихся друг от друга различным уровнем экспрессии. В изучаемых природных популяциях встречаются как гомо- так и гетерогенные формы по локусу *β*-специфичной эстеразы, что выражается в наличии соответствующих аллозимов у представителей тех или иных генотипических классов. В контрольном варианте рецессивная форма отсутствует.

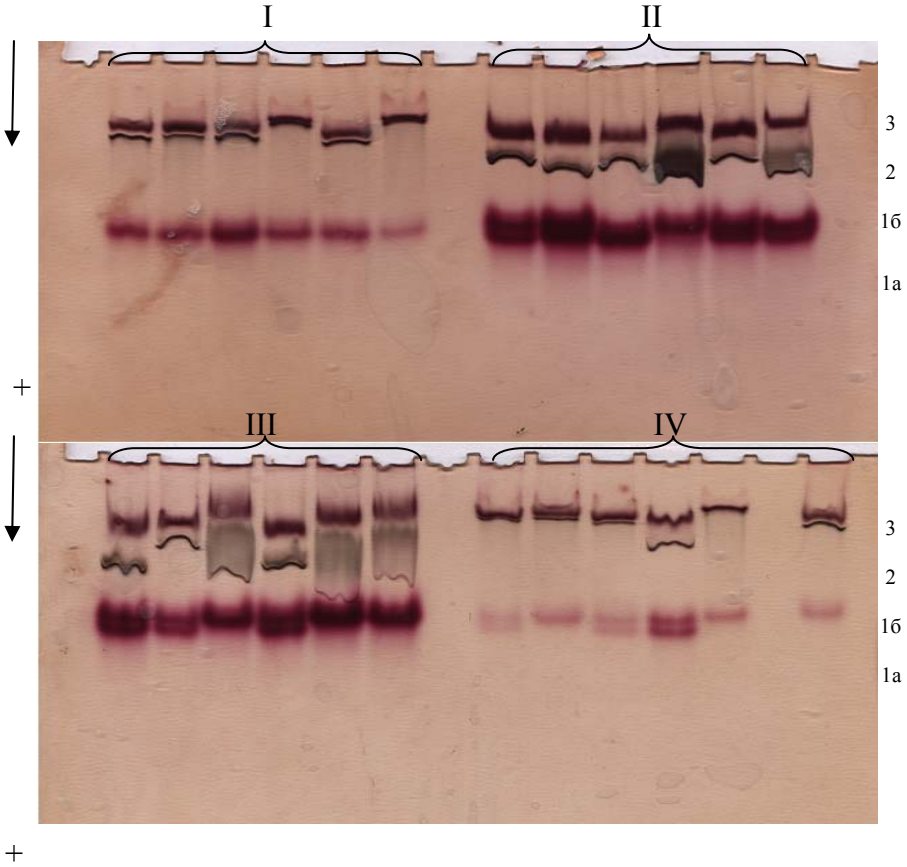

Рис. 1. Спектр карбоксиэстераз самцов имаго, принадлежащих разным популяциям *Drosophila melanogaster*:
I – лабораторная популяция *Одесская 1*, II – природная популяция *Чернобыльская 1,* III – природная популяция *Чернобыльская 2,* IV – природная популяция *Чернобыльская 3;* 1а – *F*-аллозим *β*-специфичной эстеразы, 1б – *S*-аллозим *β*-специфичной эстеразы, 2 – ацетилэстераза, 3 – ацетилхолинэстераза. Стрелками указано направление движения ферментов в ходе электрофореза.

Компьютерная денситометрия позволила дать количественную оценку уровню экспрессии каждой отдельно выявленной фракции, что характеризует уровень активности ферментов. Наглядно, результаты экспрессии карбоксиэстераз по четырем

формам ферментов у самцов имаго изучаемых популяций дрозофил представлены на рисунке 2.

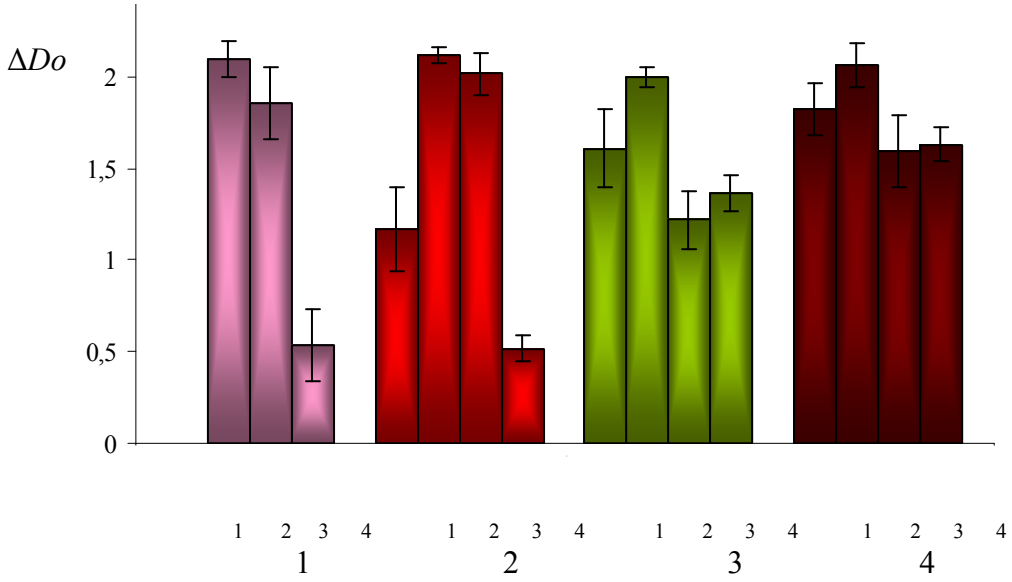

Рис. 2. Экспрессия карбоксиэстераз самцов имаго, принадлежащих разным популяциям *Drosophila melanogaster:*

По оси *x*: 1 – *F*-аллозимы *β*-специфичной эстеразы, 2 – *S*-аллозимы *β*-специфичной эстеразы; 3 – ацетилэстеразы; 4 – ацетилхолинэстеразы; 1 – самцы лабораторной популяции *Одесская 1*, 2 – природная популяция *Чернобыльская 1,* 3 – природная популяция *Чернобыльская 2,* 4 – природная популяция *Чернобыльская 3;* по оси *y:* оптическая плотность (Δ*Do,* относительные единицы) , отражающая уровень экспрессии ферментов.

Максимальный уровень экспрессии ферментов наблюдается у самцов популяций *Чернобыльская 1*, минимальный – *Чернобыльская 3*. Следует отметить, что *β*-специфичные эстеразы (как *F*-, так и *S*-аллозимы), в отличие от ацетилэстераз и ацетилхолинэстераз, оказались наиболее подверженными действию экстремального фактора (в данном случае, повышенному уровню радиации). Так, относительная активность (Δ*Do*) *S*-аллозимов самцов популяции *Чернобыльская 1* составила 2,12 ± 0,04, Δ*Do S*-аллозимов самцов популяции *Чернобыльская 3* составила 0,52 ± 0,07, при среднем значении экспрессии тех же форм *β*-эстеразы самцов линии *Одесская 1*, равная 1,17 ± 0,23. Тогда как, различия Δ*Do* ацетилэстераз изучаемых популяций составила: *Одесская 1* – 1,60 ± 0,21; *Чернобыльская 1* – 1,99 ± 0,05; *Чернобыльская 2* – 1,22 ± 0,16; *Чернобыльская 3* – 1,36 ± 0,09.

Межпопуляционные отличия, которые мы наблюдаем в экспрессии исследуемых ферментов, по всей видимости, обусловлены генетическими особенностями мух, которые складываются под влиянием факторов внешней среды.

Выводы

1. Популяции *Drosophila melanogaster* Чернобыльской зоны отчуждения, характеризуется разной экспрессивностью карбоксиэстераз, связанной с уровнем радиации в местах, где были взяты исходные родительские формы.

2. *β*-специфические эстеразы проявляют большую чувствительность к изменениям окружающей среды: при уровне радиации 50 *мкр/ч* наблюдается достаточно высокая активность аллозимов этих ферментов, при 2 100 *мкр/ч* – экспрессия S- и F-аллозимов оказывается максимально заниженной.. Ацетилэстеразы и ацетилхолинэстеразы самцов соответствующих популяций проявляют относительную устойчивость.

Литература

1. *Голуб Н. Я., Черник Я. І.* Мутації, індуковані рентгенівським опроміненням та деякими хімічними реагентами, що змінюють тривалість життя *Drosophila melanogaster // Цитология и генетика, 2008. – Т. 42, №1. – С. 37 – 44.*
2. *Андриевский А. М., Кучеров В. А., Тоцкий В. Н., Деркач Е. В*. Онтогенетические особенности экспрессии карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster //* Вісник ОНУ, 2005. – Т. 10. – Вип. 5. – С. 26 – 33.
3. *Тоцкий В. Н., Хаустова Н. Д., Андриевский А. М., Гандирук Н. Г., Белова Г. И., Есеркепова Е. В*. Экспрессивность ген-энзимных систем и показатели жизнеспособности в онтогенезе инбредных линий и гибридов дрозофилы // Генетика, 1990. – Т. 26, № 10. – С. 1791 – 1799.
4. *Андриевский А. М.* Половой диморфизм по экспрессии эфиров карбоновых кислот в популяциях *Drosophila melanogaster* // Вісник ОНУ, 2006. – Т. 11, Вип. 9. – С. 7 – 17.
5. *Андриевский А. М., Кучеров В. А*., *Кундиева Е. П.* Полове различия карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* дикого типа // Вісник ОНУ, 2006. – Т. 11, Вип. 6. – С. 26 – 31.
6. *Медведев Н. Н.* Практическая генетика. – Москва: Наука, 1966. – 238 с.
7. *Диксон М., Уэбб Э*. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Издание в 3-х томах. – Т. 1. –389с.
8. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 320 с.

Резюме

Анализировали многообразие и экспрессию молекулярных форм карбоксиэстераз у самцов природных популяций *Drosophila melanogaster,* взятых из Чернобыльской зоны отчуждения. Во всех природных популяциях установлен полиморфизм по локусу *β*-специфической эстеразы. Показаны межпопуляционные различия в экспрессии основных форм изучаемых ферментов. Обсуждается вопрос зависимости экспрессии ферментов карбоксиэстеразной системы от уровня радиации в ареалах обитания исследуемых групп дрозофил.

Аналізували різноманіття та експресію молекулярних форм карбоксиестераз у самців природних популяцій *Drosophila melanogaster,* взятих із Чорнобильської зони відчуження. В усіх природних популяціях встановлень поліморфізм по локусу *β*-специфічної естерази. Показані міжпопуляційні відмінності в експресії основних форм досліджуваних ферментів. Обговорюється питання залежності експресії ферментів карбоксиестеразної системи від рівня радіації в ареалах проживання досліджуваних груп дрозофіл.

A variety and expression of molecular forms of carboxyesterases in males from natural populations of Drosophila melanogaster taken from the Chernobyl zone of alienation have been analyzed. A polymorphism in β –specific esterase's locus has been revealed in all of natural populations. Interpopulation distinctions are shown in expression of basic forms of the studied enzymes. The question about dependence level of enzymes expression of carboxyesterases system from the level of radiation in the natural habitats of dwelling in the investigated groups of Drosophila.

ОСЬКИНА И.Н., ПРАСОЛОВА Л.А.
Институт цитологии и генетики СО РАН, пр. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090, E-mail: oskina@bionet.nsc.ru

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ БЕЛОЙ ПЯТНИСТОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДОМЕСТИКАЦИИ

Одной из особенностей формообразовательного процесса у животных при повторении одной и той же эволюционной ситуации является сходный характер