


Митотип *Drosophila melanogaster* может иметь адаптивное значение

Д.В. Петровский^{1, 2} , Л.П. Захаренко^{1, 3} 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 e-mail: dm_petr@ngs.ru; zakharlp@bionet.nsc.ru

В природных популяциях *Drosophila melanogaster* обнаруживают несколько митохондриальных клад, отличающихся друг от друга по первичной последовательности. Чаще всего это однонуклеотидные замены, часть из них консервативна. Одни клады встречаются редко, другие доминируют. В семи исследованных на сегодняшний день популяциях *D. melanogaster* клада III преобладает по сравнению с кладами V и VI. Мы сравнивали линии *D. melanogaster* с разными митотипами, но с выровненными в течение нескольких поколений беккроссами ядерными геномами, по двигательной активности (с использованием TriKinetics *Drosophila* Activity Monitor), энергообмену (методом непрямой калориметрии, на основе измерения потребления кислорода) и по длительности жизни (в экстремальных условиях содержания при 29 °C). По нашим данным, у особей с митотипом, относящимся к кладе III, выше уровень локомоторной активности и больше продолжительность жизни. По энергопотреблению исследованные линии не различаются. Однако один и тот же уровень энергообмена может быть по-разному распределен между состоянием активности и состоянием покоя. Если энергообмен в состоянии покоя у мух с разной локомоторной активностью одинаков, то особь при одинаковых тратах суммарной энергии может перемещаться на большее расстояние или дольше проявлять активность. Это можно интерпретировать как преимущество линии с митотипом, относящимся к кладе III, по сравнению с двумя другими исследованными митотипами, относящимися к кладам V и VI. Если особи имеют разный энергообмен в покое, то линии с наименьшим энергообменом в покое потратят меньше энергии при вынужденном бездействии. И в этом случае митотип, относящийся к кладе III, будет иметь преимущества. Какие нуклеотидные замены в этом митотипе могут обеспечивать адаптивное преимущество, пока остается непонятным. Мы предполагаем, что особи из широко распространенной клады III могут иметь адаптивные преимущества по сравнению с другими митотипами благодаря большей локомоторной активности даже при одинаковом энергообмене. Требуются дальнейшие исследования, поскольку митотипы полиморфны по набору однонуклеотидных замен не только между кладами, но и внутри клады.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; митотип; продолжительность жизни; локомоторная активность; энергообмен.

Для цитирования: Петровский Д.В., Захаренко Л.П. Митотип *Drosophila melanogaster* может иметь адаптивное значение. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):370-374. DOI 10.18699/VJ19.504


A *Drosophila melanogaster* mitotype may have an adaptive meaning

D.V. Petrovskii^{1, 2} , L.P. Zakharenko^{1, 3} 

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Systematics and Ecology of Animals, SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: dm_petr@ngs.ru; zakharlp@bionet.nsc.ru

Several different mitochondrial clades have been found in natural populations of *Drosophila melanogaster*. Most often, the difference is in single nucleotide substitutions, some of which are conservative. Some clades are rare, and others dominate. It has been reported that clade III dominates over clades V and VI in seven populations of *D. melanogaster*. We compared *D. melanogaster* strains with different mitotypes by locomotor activity (using TriKinetics *Drosophila* Activity Monitor), energy expenditure (by indirect calorimetry, based on measuring oxygen consumption) and life span (under extreme conditions at 29 °C). The nuclear genomes of these strains were aligned for several generations by backcrosses. According to our data, individuals with the mitotype from clade III had a higher level of locomotor activity and longer life span. In terms of energy expenditure, the strains studied did not differ. However, the same level of energy expenditure may be differently distributed between the state of activity and the state of rest or sleep. If the energy expenditure during the sleep in flies with different locomotor activity is the same, then an individual with the same overall energy expenditure can move a greater distance or be active longer. This can be interpreted as an advantage of the strain with the mitotype from clade III compared to the other two mitotypes studied. If individuals have

different energy expenditure values at rest, the strains with lower energy expenditure at rest spend less energy during forced inactivity. In this case, the mitotype from clade III should also be advantageous. What nucleotide substitutions in the mitotype from clade III can provide an adaptive advantage is not clear yet. We assume that individuals with widespread clade M(III) may have adaptive advantages compared to other mitotypes due to their greater locomotor activity even with the same energy expenditure. Further studies are required, for mitotypes are polymorphic for single nucleotide polymorphism not only between but also within the clades.

Key words: *Drosophila melanogaster*; mitotype; life span; locomotor activity; energy expenditure.

For citation: Petrovskii D.V., Zakharenko L.P. A *Drosophila melanogaster* mitotype may have an adaptive meaning. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):370-374. DOI 10.18699/VJ19.504 (in Russian)

Введение

Митохондриальный геном отвечает за обеспеченность клетки энергией, в частности кодирует ряд белков, задействованных в цикле Кребса, β -окислении жирных кислот, окислительном фосфорилировании. В ряде работ отмечают связь между структурой мтДНК и длительностью жизни (Lehmann et al., 2008; Muradian et al., 2010). Например, считается, что у плацентарных млекопитающих повышенная частота мутирования митохондриальной ДНК позволяет увеличить длительность жизни за счет селективного преимущества мутаций, уменьшающих наработку активных форм кислорода (Rottenberg, 2007). У *Drosophila simulans* с разными митогаплотипами выявляют разницу по АТФазной активности, содержанию митохондриального цитохрома С, перекиси водорода и другим биоэнергетическим показателям (Katewa, Ballard, 2007). Хотя в цитируемой работе использовали *D. simulans* из симпатрических популяций, влияния митоядерных взаимодействий на наблюдаемые различия исключить нельзя (Stuart, Brown, 2006). Среди множества теорий старения особое место занимает свободнорадикальная теория старения, согласно которой активные формы кислорода, синтезируемые главным образом в митохондриях, нарушают работу клеток (Harman, 1956; Halliwell, 2012).

В силу большой вариабельности митохондриальной ДНК разница между митохондриями разных линий может достигать более 100 SNP (Zhu et al., 2014). Исследователи полиморфизма мтДНК *D. melanogaster* выделяют несколько митохондриальных клад. По одной классификации выделяют клады М и S, различающиеся по однонуклеотидной консервативной замене 37С/Т (позиция 2187 в последовательности GenBank accession number NC001709) (Richardson et al., 2012; Илинский и др., 2013; Pinsky, 2013). По другой классификации выделяют восемь клад, которые группируются следующим образом: М(I–V, VIII) и S(VI–VII) и отличаются друг от друга набором однонуклеотидных замен, часть из которых консервативна (Richardson et al., 2012; Early, Clark, 2013; Pinsky, 2013). М(III) клады в природных популяциях Raleigh, North Carolina (США) (Richardson et al., 2012), Beijing (Китай), Ithaca (NY, США), Netherlands, Tasmania, and Zimbabwe (Early, Clark, 2013) преобладает по сравнению с кладами М(V) и S(VI) и высоко полиморфна по набору SNP. Внутрипопуляционная вариабельность цитоплазматических генов может влиять на продолжительность жизни и другие физиологические параметры (Maklakov et al., 2006).

Мы сравнивали линии с разными митотипами (М(III) – митогаплотип из клады III, М(V) – митогаплотип из клады V и S(VI) – митогаплотип из клады VI) по двигательной

активности, энергопотреблению и длительности жизни, чтобы понять, существуют ли физиологические преимущества у какого-либо из исследованных митотипов.

Материалы и методы

Линии дрозофил. Митохондрии считают важным фактором, влияющим на продолжительность жизни и другие физиологические параметры. Однако на вариабельность митохондриального генома может накладываться генетический фон, обусловленный ядерным геномом (Clancy, 2008). Митохондриальный геном наследуется по материнской линии, тогда как ядерный геном достается потомкам от обоих родителей. Используя эту особенность наследования, при помощи беккроссов можно получить линии с разными митотипами, но с одной и той же ядерной ДНК. Насыщающие возвратные скрещивания в течение не менее 10 поколений с самцами линии Vi90 позволили получить линии дрозофил со сходным ядерным геномом, но с тремя разными митохондриальными геномами: М(III), М(V) и S(VI). Линии дрозофил, используемые в работе, были любезно предоставлены Н.Е. Грунтенко. Поскольку инфицированность линии вольбахиями может давать вклад в жизненно важные физиологические показатели (Gruntenko et al., 2017), мух выращивали на корме с тетрациклином (0.25 мг/мл) в течение двух поколений. Такая обработка антибиотиком не влияет на длительность жизни дрозофил (Min, Benzer, 1997). Часть линий была задублирована, чтобы исключить возможное влияние неполного замещения генома (Gruntenko et al., 2017). Мы исследовали линии на основе ядерного генома линии Vi90: М(III) – митотип из клады III (исходный геном линии W304 – две отводки), М(V) – митотип из клады V (исходный геном линии B90 – две отводки) и S(VI) – митотип из клады VI (исходные геномы линий W1118 (две отводки) и W153 и W181 (по одной отводке каждая)).

Измерение энергообмена проводили методом непрямой калориметрии, на основе измерения потребления кислорода в герметичной камере со щелочью. Животные при дыхании потребляют кислород и выделяют углекислый газ и воду. Углекислый газ, в свою очередь, реагирует со щелочью (в нашем случае гидроокись калия), образуя твердое вещество (K_2CO_3). Таким образом, давление в камере падает пропорционально изъятому кислороду. Установка для измерения энергообмена была сконструирована по аналогии с ранее описанной (Diarga et al., 1999) с небольшими модификациями. Она состояла из 10 термостатированных камер (8 измерительных камер и 2 камеры сравнения) объемом 3 мл каждая и одного датчика давления. В каждую камеру помещали по 10 самцов

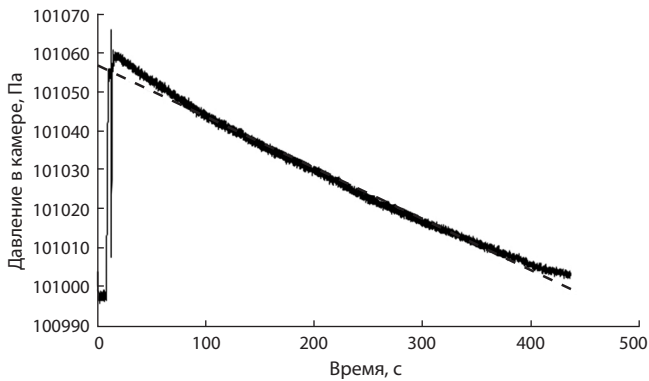


Рис. 1. Пример измерения потребления кислорода. Сплошная линия – давление в камере, штриховая – аппроксимирующая прямая.

в возрасте 3–7 дней. Эксперимент проводили при 29 °С с 11:00 до 16:00 через 1 ч после посадки мух. Падение давления в каждой камере измеряли в течение 6 мин в двух повторах.

Для оценки уровня энергообмена измеряли угол наклона аппроксимирующей прямой на графике, отражающем изменение давления в камере (рис. 1). Для статистической обработки брали среднее значение по двум повторам. Сразу после эксперимента мух взвешивали. Всего было проведено четыре эксперимента.

Двигательную активность самцов тестируемых линий измеряли с использованием TriKinetics *Drosophila* Activity Monitor (Trikinetics, Waltham, MA, США). Каждого самца помещали в стеклянную трубку со стандартным кормом. Активность определяли по числу пересечений самцом инфракрасного луча за одну минуту в течение пяти дней. В качестве показателя среднесуточной локомоторной активности для каждой мухи рассчитывали среднечасовую активность с 11:00 по 16:00 со второго по четвертый день эксперимента. В анализ брали данные по мухам, которые дожили до конца эксперимента. В каждой линии было проанализировано от 12 до 16 особей в возрасте 3–7 дней. Эксперимент проводили при 29 °С.

Длительность жизни определяли при 29 °С. В каждую пробирку сажали по 20 самцов. Корм меняли два раза в неделю. В анализ брали по пять пробирок на каждую линию.

Статистическая обработка. Статистический анализ проводили в программе Statistica 6.0. Для сравнения средних использовали LSD (least significant difference). Длительность жизни оценивали с помощью теста logrank (Bland, Altman, 2004) с применением критерия χ^2 .

Результаты

В дневные часы максимальная локомоторная активность была у дрозофил с митотипом M(III) (рис. 2). Среднесуточная активность у мух с митотипом M(III) составила 51.2 ± 5.9 пересечений за 1 ч, что достоверно выше ($p < 0.02$), чем активность мух с митотипом S(VI) (39.9 ± 2.9) и достоверно выше ($p < 0.05$) активности мух с митотипом M(V) (35.0 ± 4.0). Среднесуточная активность мух митотипов M(V) и S(VI) не различалась ($p > 0.4$).

Потребление кислорода в пересчете на одну муху в среднем составило 2.76 мкл/ч. У исследованных мух

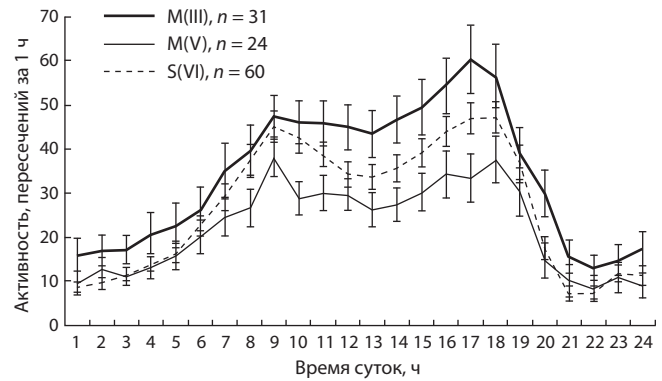


Рис. 2. Суточная динамика двигательной активности дрозофил с разными митотипами (mean \pm SE).

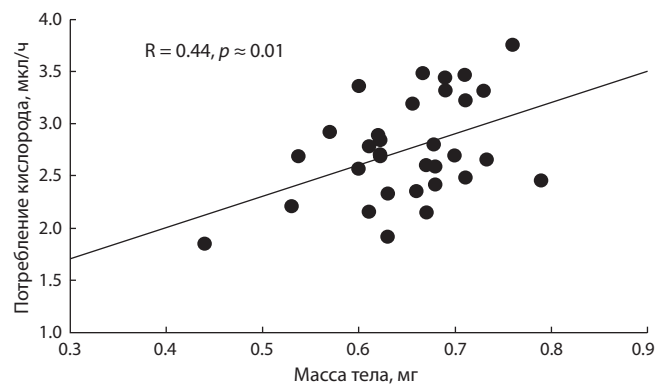


Рис. 3. Корреляция усредненных значений потребления кислорода со средней массой тела мух.

Энергообмен у дрозофил с разными митотипами

Митотип	n	Масса тела, мг	Среднее потребление O ₂	
			на одну муху, мкл/ч	на массу тела, мл/г/ч
M(III)	8	0.662 \pm 0.014	2.83 \pm 0.19	4.27 \pm 0.25
M(V)	8	0.653 \pm 0.019	2.79 \pm 0.19	4.31 \pm 0.35
S(VI)	12	0.644 \pm 0.023	2.70 \pm 0.11	4.21 \pm 0.12

Примечание. n – число особей. Данные представлены как mean \pm SE.

этот показатель достоверно коррелировал с массой тела ($R = 0.44$, $p \approx 0.01$) (рис. 3). Усредненные по линиям значения потребления кислорода на уровне тенденции коррелировали со среднесуточной активностью ($R = 0.61$, $p \approx 0.1$). Потребление кислорода в пересчете на массу тела мух не коррелировало с массой тела ($p > 0.2$) и среднесуточной активностью даже на уровне тенденции ($p > 0.8$). Достоверных различий между митотипами ни по массе, ни по потреблению кислорода не выявлено (таблица).

Длительность жизни мух митотипа M(III) была достоверно больше, чем длительность жизни мух митотипа S(VI) ($\chi^2 = 9.24$, $p < 0.01$) и митотипа M(V) ($\chi^2 = 4.83$, $p < 0.05$), достоверных различий между митотипами S(VI) и M(V) по продолжительности жизни не обнаружено (рис. 4).

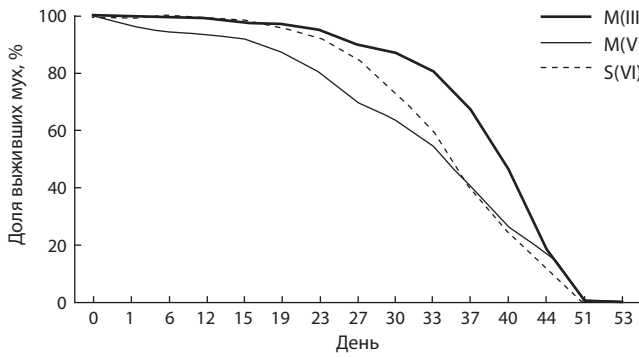


Рис. 4. Длительность жизни самцов с разными митотипами.

Обсуждение

Муши с митотипом М(III), по нашим данным, отличаются более высоким уровнем двигательной активности, однако имеют такой же энергообмен, как и муши с митотипами М(V) и S(VI), что можно рассматривать как адаптивное преимущество мух с митотипом М(III). Зависимость потребления кислорода от активности можно аппроксимировать линейно (Шмидт-Ниельсен, 1982), тогда угол наклона прямой можно назвать ценой активности или коэффициентом полезного действия, а пересечение этой прямой с осью ординат будет отражать метаболизм покоя или метаболизм при нулевой активности. У мух с разным генотипом один и тот же уровень энергообмена может быть по-разному распределен между состоянием активности и состоянием покоя. Поскольку в нашем случае для каждого митотипа мы имеем единственную точку на плоскости активность/энергообмен, а через одну точку можно провести бесконечное количество прямых, то однозначно оценить распределение энергии между состоянием покоя и состоянием активности нельзя. Тем не менее рассмотрим два крайних случая.

Если энергообмен в состоянии покоя у мух с разным митотипом будет одинаковым, то у аппроксимирующих прямых для этих митотипов будут разный наклон и, соответственно, разная цена активности (рис. 5, а). Наименее крутая прямая (для линии с М(III) митотипом) будет означать, что особь при одинаковых тратах энергии может перемещаться на большее расстояние или дольше проявлять активность. Это можно интерпретировать как преимущество линии с М(III) митотипом по сравнению с двумя другими исследованными митотипами.

Если же особи имеют разный энергообмен в покое (см. рис. 5, б) и одинаковую цену активности (одинаковый угол наклона аппроксимирующих кривых), то и в этом случае линии с М(III) митотипом получают преимущество над линиями с другими исследованными митотипами, поскольку наименьший энергообмен в покое позволит потратить меньше энергии при вынужденном бездействии при неблагоприятных условиях.

Скорее всего, истинная картина будет отличаться от этих двух крайних случаев. Для выяснения истинной зависимости энергообмена от активности лучше изучать эти параметры одновременно. Тогда для каждой линии можно получить несколько значений энергообмена и активности и увидеть реальную картину влияния митотипа.

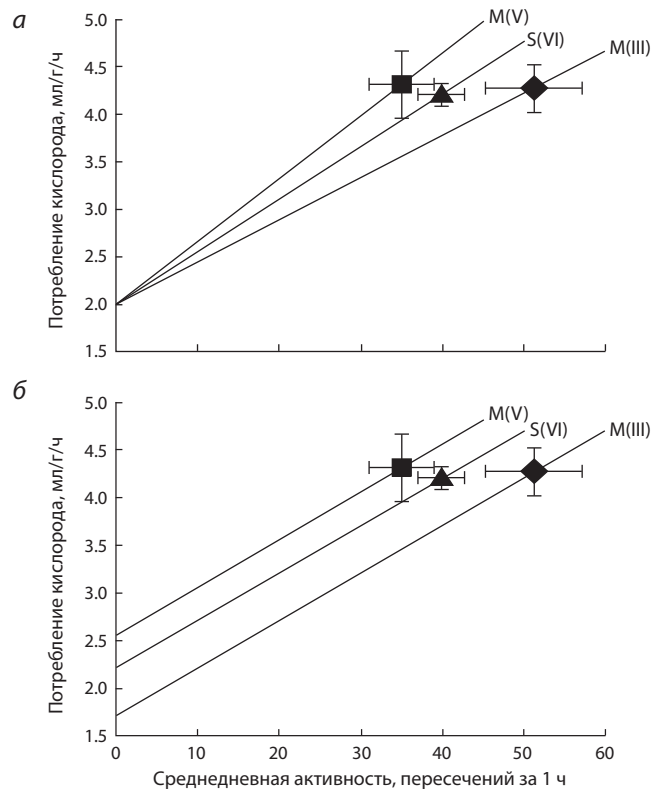


Рис. 5. Гипотетические варианты зависимости энергообмена от локомоторной активности для мух с разными митотипами.

У мух с разными митотипами: а – одинаковый уровень потребления кислорода при нулевой активности, но различаются углы наклона аппроксимирующих прямых; б – одинаковые углы наклона аппроксимирующих прямых, но различаются уровни потребления кислорода при нулевой активности.

Продолжительность жизни не коррелирует с уровнем выделения углекислого газа у *Drosophila simulans* (Melvin et al., 2007), что подтверждается и в наших экспериментах для *Drosophila melanogaster*. Однако продолжительность жизни самцов с митотипом М(III) при содержании в экстремальных условиях (29 °С) оказалась несколько выше, чем с митотипом М(V) и S(VI), не различающихся между собой.

Заключение

Мы предполагаем, что особи из линии с митотипом М(III), относящиеся к самой распространенной кладе, могут иметь адаптивные преимущества по сравнению с другими митотипами благодаря большей локомоторной активности. Какие нуклеотидные замены в М(III) митотипе могут обеспечивать адаптивное преимущество, пока остается непонятным. Требуются дальнейшие исследования на большем числе линий, относящихся как к одной и той же кладе, так и к разным митотическим кладам.

Список литературы / References

Илинский Ю.Ю., Быков Р.А., Захаров И.К. Цитотипы мутантных линий *Drosophila melanogaster* фонда лаборатории генетики популяций института цитологии и генетики СО РАН: генотипы эндосимбионта *Wolbachia* и митотипы вида-хозяина. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17:407-415.

- [Ilinsky Yu.Yu., Bykov R.A., Zakharov I.K. Cytotypes of mutant *Drosophila melanogaster* stocks from the collection of the genetics of population laboratory of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS: genotypes of the *Wolbachia* endosymbiont and host mitotypes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17:407-415. (in Russian)]
- Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. М.: Мир, 1982; Кн. 1.
[Schmidt-Nielsen K. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. London–New York, Cambridge University Press, 1975. (Russ. ed. Schmidt-Nielsen K. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. Book 1. Moscow: Mir Publ., 1982). (in Russian)]
- Bland J.M., Altman D.G. The logrank test. *The BMJ*. 2004;328:1073-1074.
- Clancy D.J. Variation in mitochondrial genotype has substantial lifespan effects which may be modulated by nuclear background. *Aging Cell*. 2008;7(6):795-804. DOI 10.1111/j.1474-9726.2008.00428.x.
- Diarra G.M., Roberts T.W., Christensen B.M. Automated measurement of oxygen consumption by the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999;60:859-864.
- Early A.M., Clark A.G. Monophyly of *Wolbachia pipientis* genomes within *Drosophila melanogaster*: geographic structuring, titre variation and host effects across five populations. *Mol. Ecol.* 2013;23:5765-5778. DOI 10.1111/mec.12530.
- Gruntenko N.E., Ilinsky Y.Y., Adonyeva N.V., Burdina E.V., Bykov R.A., Menshanov P.N., Rauschenbach I.Y. Various *Wolbachia* genotypes differently influence host *Drosophila* dopamine metabolism and survival under heat stress conditions. *BMC Evol. Biol.* 2017;17(Suppl. 2):252. DOI 10.1186/s12862-017-1104-y.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr. Rev.* 2012;70:257-265. DOI 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956;11:298-300. DOI 10.1093/geronj/11.3.298.
- Ilinsky Y. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* genotypes. *PLoS One*. 2013;8(1):e54373. DOI 10.1371/journal.pone.0054373.
- Katewa S.D., Ballard J.W. Sympatric *Drosophila simulans* flies with distinct mtDNA show difference in mitochondrial respiration and electron transport. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2007;37(3):213-222.
- Lehmann G., Segal E., Muradian K.K., Fraifeld V.E. Do mitochondrial DNA and metabolic rate complement each other in determination of the mammalian maximum longevity? *Rejuvenation Res.* 2008;11:409-417.
- Maklakov A.A., Friberg U., Dowling D.K., Arnqvist G. Within-population variation in cytoplasmic genes affects female life span and aging in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 2006;60:2081-2086.
- Melvin R.G., Van Voorhies W.A., Ballard J.W. Working harder to stay alive: metabolic rate increases with age in *Drosophila simulans* but does not correlate with life span. *J. Insect Physiol.* 2007;53:1300-1306.
- Min K.T., Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94:10792-10796.
- Muradian K.K., Lehmann G., Fraifeld V.E. NUMT (“new mighty”) hypothesis of longevity. *Rejuvenation Res.* 2010;13:152-155. DOI 10.1089/rej.2009.0974.
- Richardson M.F., Weinert L.A., Welch J.J., Linheiro R.S., Magwire M.M., Jiggins F.M., Bergman C.M. Population genomics of the *Wolbachia* endosymbiont in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 2012;8(12):e1003129. DOI 10.1371/journal.pgen.1003129.
- Rottenberg H. Coevolution of exceptional longevity, exceptionally high metabolic rates, and mitochondrial DNA-coded proteins in mammals. *Exp. Gerontol.* 2007;42(4):364-373.
- Stuart J.A., Brown M.F. Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006;1757(2):79-89.
- Zhu C.T., Ingelmo P., Rand D.M. G×G×E for lifespan in *Drosophila*: mitochondrial, nuclear, and dietary interactions that modify longevity. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004354. DOI 10.1371/journal.pgen.1004354.

ORCID ID

D.V. Petrovskii orcid.org/0000-0002-0623-0363

L.P. Zakharenko orcid.org/0000-0002-6341-8522

Благодарности. Работа поддержана бюджетным проектом 0324-2019-0041. Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Авторы благодарят Н.Е. Грунтенко за предоставленные линии, Ю.Ю. Илинского – за консультации по характеристике митотипов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.10.2018. После доработки 18.01.2019. Принята к публикации 01.02.2019.