

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА *Adh* В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Работа поддержана грантом РФФИ № 05-04-48838 и Программой Президиума РАН «Биоразнообразию и динамика генофондов»

Изучено разнообразие последовательностей ДНК фрагмента гена алкогольдегидрогеназы (*Adh*) в природных популяциях *Drosophila melanogaster* России, Украины и Киргизии. Отмечено наличие F-формы фермента во всех изученных популяциях. Выявлен один вариант последовательности ДНК, соответствующий F-форме *Adh*, и три, соответствующих S-форме. Два из трех аллелей S-формы *Adh* не аннотированы в базе данных ДНК и, вероятно, появились в результате кроссинговера и мутационного процесса. Третий аллель, описанный нами как вариант S, может представлять собой нуль-аллель.

Особенности генетического полиморфизма в популяциях определяются отбором, мутационным и миграционным процессами, дрейфом генов. Вклад каждого из этих факторов в изменчивость различных генетических локусов варьирует в зависимости от функциональной нагрузки гена (или нуклеотидной последовательности). Изменчивость нуклеотидных последовательностей зависит от их функциональной нагрузки и эффектов попутного отбора [1]. Известно, что в особенности изменчивости микросателлитных участков ДНК основной вклад вносит мутационный процесс, тогда как в изменчивость по хромосомным перестройкам – отбор.

Высокая изменчивость при подверженности действию отбора показана для гена алкогольдегидрогеназы (*Adh*), хорошо изученного методом изоферментного анализа [2]. Так как развитие личинок *Drosophila melanogaster* происходит в условиях повышенной концентрации этанола (в бродящих субстратах), то эффективность утилизации этого вещества, определяемая активностью алкогольдегидрогеназы, важна для их выживания. Показана долготная клинальная изменчивость частот быстрой (Fast, F) и медленной (Slow, S) – по электрофоретической подвижности форм соответствующего фермента [3]. Активность фермента определяется не только единичной аминокислотной заменой, приводящей к изменению ферментических и каталитических свойств фермента, но и особенностями последовательности ДНК соответствующего гена [4, 5].

Полиморфизм по *Adh* для популяций *Drosophila melanogaster* большей части территорий Азии и Восточной Европы не был описан. В ходе данной работы был изучен полиморфизм нуклеотидной последовательности фрагмента гена *Adh* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* России, Украины и Киргизии, а также оценено соотношение S- и F-форм *Adh*.

Материал и методы

Изучены нуклеотидные последовательности фрагмента гена *Adh* в выборках из популяций *Drosophila melanogaster* России, Украины и Киргизии (таблица).

В анализ бралась 1 особь-имаго из изосамочьей линии. Каждая изосамочья линия представляет потомство оплодотворенной в природе самки, которое поддерживается с момента основания линии в фонде лаборатории генетики популяций ИЦиГ СО РАН. При исследовании одной выборки (Томск, 2006) в анализ брались дрозофилы, отловленные непосредственно в популяции. Выделение ДНК производилось по стандартной методике [6]. Выделенную ДНК растворяли в 50 мкл бидистиллированной воды. Для работы использовали специфичные к фрагменту гена *Adh* праймеры состава: 5'-ATTGCCGTCAACTACACTGG-3' (forward) и 5'-GGTTCGCGAACCCSTATGAAC-3' (reverse). Синтез праймеров был осуществлен в секторе химии нуклеиновых кислот ИЦиГ СО РАН. Данные праймеры фланкируют участок гена, включающий в себя интрон 3 и экзон 4 гена *Adh*.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл. Реакционная смесь для ПЦР фрагмента гена *Adh* содержала: 1xPCR-buffer, 4 mM MgCl₂, 0,1 mM каждого dNTP, 0,3 mM каждого праймера и 2,5 ед Taq-полимеразы. На одну реакцию по 1 мкл исходного раствора ДНК. ПЦР проводили при следующих условиях: денатурация при 94°C – 1 мин.; отжиг при 57°C – 1 мин; полимеризация при 72°C – 1 мин; в последнем цикле стадия полимеризации продолжалась 5 мин при 72°C. Продукт реакции очищали путем электрофореза в 1% агарозном геле. Реакцию секвенирования проводили с помощью реактива Big Dye 3.1. Продукты секвенирования разделяли электрофоретически и строили соответствующие хроматограммы в межинститутском центре секвенирования ДНК СО РАН. Учитывали нуклеотиды, начиная от 49-го после сайта посадки праймера forward. Различные варианты последовательностей S-формы *Adh*, выявленные в ходе работы, маркировались как S₁, S₂ ... S_n. Единственный вариант Fast-формы *Adh* маркировался как F.

Полученные последовательности были сравнены с таковыми из базы данных ДНК DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>); номера последовательностей: M22210, M17827, M17828, M17830, M17831, M17832, M17833, M17834, M17835, M17836, M17837, M19547, M36580, X04454, X60791, X60792, X60793 и U20765.

Генотипы по участку гена *Adh* в природных популяциях *Drosophila melanogaster*

Популяция (год, регион)	Линия	Генотип особи
Умань, 1984, Черкасская область, Украина	U84101	F/F
	U84399	F/F
	U84413	F/F
	U84526	F/F
Умань, 1993, Черкасская область, Украина	U93011	F/F
	U93014	F/F
	U93033	F/F
	U93080	F/F
Никополь, 1997, Днепропетровская область Украина	N97003	F/F
	N97011	F/S ₁
	N97021	F/F
	N97025	F/S ₂
Бийск, 1993, Алтайский край, Россия	B93235	F/F
	B93343	S ₂ /S ₂
	B93350	F/F
	B93351	F/F
	B93397	F/S ₃
	B93364	F/F
Белокуриха, 2000, Алтайский край, Россия	B14	F/F
	B15	F/F
	B16	F/F
	B20	F/F
	B37	F/F
Горно-Алтайск, 1993, Республика Горный Алтай, Россия	GA93010	S ₂ /S ₂
	GA93066	F/F
	GA93080	F/F
	GA93124,	F/F
	GA93146	S ₂ /S ₂
Сочи, 2004, Краснодарский край, Россия	S406	F/F
	S407	F/F
	S415	F/F
	S421	F/F
	S426	F/F
	S431	F/F
Ижевск, 2002, Удмуртия, Россия	I295	F/F
	I329	F/F
	I336	F/F
	I341	F/F
	I343	F/F
Нальчик, 2006, Кабардино-Балкария, Россия	N1-2	F/F
	N1-3	F/F
	N1-4	F/F
	N2-2	F/F
	N3-4	F/F
Бишкек, 2004, Киргизия	Bi1	S ₂ /S ₃
	Bi3	F/S ₁
	Bi31	S ₁ /S ₁
	Bi62	F/F
Томск, 2006, Россия	Tif1	F/F
	Tif2	S ₂ /S ₂
	Tif3	F/S ₃
	Tm1	S ₂ /S ₃
	Tm2	F/S ₂
	Tm3	F/F

Результаты

Отмечено сохранение гетерозиготности по нуклеотидной последовательности фрагмента в линиях, дли-

тельно культивируемых в лабораторных условиях. В частности, отмечены гетерозиготы в линии из Бийска (1993 г.) Бишкека (2004 г.) и Никополя (1997 г.), три из шести изученных особей из г. Томска были также гете-

розиготами. Для выборок с Украины, Кавказа и Урала показано преобладание F-формы (исключение составляют две линии из Никополя, полиморфные по этому признаку); S-форма отмечается в выборках популяций Алтая, Бишкека и Томска (см. таблицу).

Изученные последовательности у гомозигот по *Adh* оказались сходными с приведенными в базе данных ДНК (рис. 1). Последовательности F выявлены во всех выборках и идентичны как друг другу, так и последовательностям, аннотированным в базе данных под номерами M17833, M17834, M17835, M17836, X60791 и X60792. Для образцов M17833, M17834, M17835 и

M17836 указано, что они происходят из разных частей ареала *Drosophila melanogaster* (Северная Америка, Западная Европа, Африка). Выявленный в нашей работе вариант последовательности *Adh F*, по-видимому, является наиболее широко распространенным в мире. Отмеченные в нашем исследовании последовательности *Adh S* более разнообразны. Выявлено 3 варианта последовательности *Adh S*, при этом один из них (S₃) соответствует аннотированному варианту. Вариант S₁ отмечен на Украине и в Киргизии; S₂ – на Украине, Алтае, в Киргизии и Томске; S₃ – на Алтае, в Киргизии и Томске.

Вариабельные сайты	111111222222233333444
	15234677800126903378678
Линии/образцы	498974245006875320215800
M18733	CCCGGACGATCTGTCTCCCGCCA
F
N97011 (F/S1)	Y.....SYMYY.MR.M..
N97025 (F/S2)SR.....SYMYY.MR...M
GA93010 (S2/S2)GA....CCACT.AA...C
B93397 (F/S3)S.M.....
Vi31 (S1/S1)	T.....CCACT.AA.A..
M36580	TT.....C.A.....
M17832C.A.T.A...
M17837G.....
X04454A...
M22210T.A...
M17830CCACT.AA.A..
M17827	T.ACA...TAACCCACT.A.A..
M17831CCACT.A.....
X60793GA....CCACT.AA...
U20765C.A.....

Рис. 1. Вариабельные сайты в аннотированных и изученных последовательностях ДНК участка гена *Adh Drosophila melanogaster*. Позиции выровнены относительно начала изученных образцов ДНК. Жирным шрифтом выделен сайт, замены по которому определяют электрофоретическую подвижность фермента (S- и F-формы). Полиморфные позиции у гетерозигот обозначены 15-буквенным кодом. Среди групп, аннотированных и изученных в работе последовательностей ДНК, приведены только неповторяющиеся варианты

Обсуждение

Как было отмечено выше, ген алкогольдегидрогеназы *Drosophila melanogaster* характеризуется выраженной клинальной изменчивостью. Быстрая форма фермента более активна и менее стабильна, чем медленная. В тропических популяциях *Drosophila melanogaster* (примерно до 25° с.ш.) доля S-формы наиболее велика, составляя в популяции 70–100%. С увеличением широты доля S-формы фермента в популяциях падает. При этом в изученных популяциях восточного побережья Северной Америки на широте 50° доля F-формы составляет около 75%, а в популяциях той же широты из Европы доля F-формы составляет 90–100% [3]. Клинальная изменчивость по *Adh* в популяциях *Drosophila melanogaster* выявлена на территории Северной Америки, Европы, Африки, а также Японии и Индии [7]. Таким образом, выявленное нами преобладание F-формы фермента в популяциях Северной Евразии – это предсказуемый результат. Тем не менее отмечено наличие S-формы в популяциях Томска и Алтая, расположенных к северу от 50-й параллели. В то же время есть данные, что межаллельные отношения продуктов гена *Adh* носят характер выраженного сверхдоминирования [8], при значениях равновесной частоты F-формы

(в лабораторных условиях) 40–70%. Этот факт может способствовать длительному сохранению полиморфизма по электрофоретически выявляемым аллелям *Adh*.

Показано, что относительно низкое разнообразие последовательностей F-аллелей *Adh* связано с их недавним происхождением и с ассоциацией с инверсией [9]. Тем не менее можно было ожидать широкого распространения нескольких вариантов нуклеотидных последовательностей *Adh F*. Единообразие последовательностей F *Adh*, выявленное в данной работе, по-видимому, объясняется адаптивностью именно данной последовательности гена (или кластера генов) к условиям среды Северной Евразии, так как какое-либо действие миграционного процесса должно было привести к распространению иных вариантов последовательности Fast-формы *Adh*, а действие генетического дрейфа, приводящее к единообразию различных популяций по набору аллелей, маловероятно.

Последовательность S₁ имеет набор нуклеотидных замен, описанный для различных аннотированных последовательностей *Adh S*. По-видимому, его происхождение связано с кроссинговером. В частности, при кроссинговере между аннотированными последовательностями M17830 и M17827 (эти последовательности

сти описаны для *Drosophila melanogaster* из Западной Европы (Франции) и Северной Америки, соответственно) в области 4–58 п.н., должен образоваться продукт, идентичный S₁ (см. рис. 1). Последовательности S₂ и X60793 отличаются друг от друга одной нуклеотидной заменой, не отмеченной у других аннотированных последовательностей. S₂-последовательность является дочерней по отношению к X60793.

Последовательность S₃, встречающаяся в ходе работы только в гетерозиготном состоянии, идентична соот-

ветствующему фрагменту U20765, которая описана в базе данных как нуль-аллель. Не известно, являются ли выявленные последовательности S₃ нуль-аллелями, так как ни стоп-кодона, ни микроделеции в кодирующей части изученного фрагмента гена *Adh* нами не обнаружены. Однако мы не можем исключить их наличие в не изученной нами части гена. Если же S₃ – нуль-аллель, то он является распространенной летальной мутацией в азиатских популяциях *Drosophila melanogaster*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гундерина Л.И. Полиморфизм ДНК генов *Drosophila* и определяющие его факторы // Генетика. 2003. Т. 39, № 7. С. 888–899.
2. Singh R.S. Population genetics and evolution of species related to *Drosophila melanogaster* // Annu. Rev. Genet. 1989. Vol. 23. P. 425–453.
3. David J.R., Capy P. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations // Trends in Genetics. 1988. Vol. 4, № 4. P. 106–111.
4. Laurie C.C., Birdgham J.T., Choudhary M. Associations between DNA sequence variation in expression of the *Adh* gene in natural populations of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1991. Vol. 129, № 2. P. 489–499.
5. Dunn R.C., Laurie C.C. Effects of transposable element insertion on alcohol dehydrogenase expression in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1995. Vol. 140, № 2. P. 667–677.
6. Bender W., Pierre S., Hognes D.S. Chromosome walking and jumping to isolate DNA from *Ace* and *rosy* loci of *bithorax* complex in *Drosophila melanogaster* // J. Mol. Biol. 1983. Vol. 168. P. 17–33.
7. Shamina, Parkash R. *Adh* allozymic variation in *D. melanogaster* populations from India // Drosophila Inf. Serv. 1993. № 72. P. 97–98.
8. Bijlsma-Meels F., Bijlsma R. The alcohol dehydrogenase polymorphism in *Drosophila melanogaster*: Fitness measurements and predictions under conditions with no alcohol stress // Genetics. 1988. Vol. 120, № 3. P. 743–753.
9. Veuille M., Benassi V., Aulard S. et al. Allele-specific structure of *Drosophila melanogaster* alcohol dehydrogenase at molecular level // Genetics. 1998. Vol. 149, № 2. P. 971–981.

Статья поступила в редакцию журнала 12 сентября 2006 г., принята к печати 5 декабря 2006 г.