

... ГЕНЕТИКА ... GENETICS ...

УДК: 575.2.084:57.044:595.773.4

Изменения количественных признаков *Drosophila melanogaster* при действии донора метильных групп – бетаина. 1. Анализ компонентов приспособленности и экспрессивности признака *radius incompletus*

Н.Е.Волкова, Н.С.Филипоненко, В.В.Костенко, Л.В.Исипенко, Д.С.Евстафьев, В.В.Навроцкая, Л.И.Воробьева

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
volkova_natalya@bk.ru

Проведено исследование действия метил-обогащенной диеты на проявление количественных признаков *Drosophila melanogaster*. Обнаружена обратная пропорциональная полиномиальная зависимость между концентрацией донора метильных групп бетаина в питательной среде и показателями плодовитости и жизнеспособности. Действие минимальной концентрации ($1,3 \cdot 10^{-5}\%$) приводит к повышению плодовитости, плодовитости и к снижению гибели во время метаморфоза. Концентрация бетаина 5% в среде обуславливает снижение плодовитости и жизнеспособности линий, повышение уровня эмбриональной смертности, вызывает снижение экспрессивности мутантного признака *radius incompletus* (прерванная радиальная жилка крыла) у самцов. Жизнеспособность потомства (F1) особей, содержащихся на среде с бетаином ($1,3 \cdot 10^{-1}\%$ и 5%) снижена по сравнению с контрольной группой. Концентрация бетаина 10% в среде является летальной для данного вида.

Ключевые слова: дрозофила, метил-обогащенная диета, бетаин, метилирование, компоненты приспособленности, экспрессивность признака *radius incompletus*.

Зміни кількісних ознак *Drosophila melanogaster* при впливі донора метильних груп – бетаїну. I. Аналіз компонентів пристосованості та експресивності ознаки *radius incompletus*

Н.Є.Волкова, Н.С.Філіпоненко, В.В.Костенко, Л.В.Ісипенко, Д.С.Євстаф'єв, В.В.Навроцька, Л.І.Воробйова

Проведено дослідження впливу метил-збагаченої дієти на прояв кількісних ознак *Drosophila melanogaster*. Виявлена зворотно пропорційна поліноміальна залежність між концентрацією донора метильних груп бетаїну у поживному середовищі та показниками плодючості і життєздатності. Вплив мінімальної концентрації ($1,3 \cdot 10^{-5}\%$) призводить до підвищення життєздатності, плодючості і до зниження загибелі особин під час метаморфозу. Концентрація бетаїну 5% у середовищі зумовлює зниження плодючості і життєздатності ліній, підвищення рівня ембріональної летальності, викликає зниження експресивності мутантної ознаки *radius incompletus* (перервана радіальна жилка крила) у самців. Життєздатність потомства особин (F1), які утримувались на середовищі з бетаїном ($1,3 \cdot 10^{-1}\%$ і 5%) також знижена порівняно з контрольною групою. Концентрація бетаїну 10% у середовищі є летальною для даного виду.

Ключові слова: дрозофіла, метил-збагачена дієта, бетаїн, метилування, компоненти пристосованості, експресивність ознаки *radius incompletus*.

Changes of *Drosophila melanogaster* quantitative traits at the influence of the donor of methyl groups – betaine. I. Analysis of adaptability components and expressiveness of the trait *radius incompletus*

N.Ye.Volkova, N.S.Philiponenko, V.V.Kostenko, L.V.Isipenko, D.S.Yevstafiev, V.V.Navrotskaya, L.I.Vorobyova

The study of methyl-enriched diet influence on *Drosophila melanogaster* quantitative traits manifestation has been conducted. Reverse proportional polynomial dependence between concentration of a methyl group donor betaine in the nutritive medium and parameters of fertility and viability has been revealed. The influence of minimal concentration ($1,3 \cdot 10^{-5}\%$) results in increase of fertility and viability and in decrease of lethality at metamorphosis. 5% concentration of betaine in the medium decreases fertility and viability, and expressiveness of mutant trait *radius incompletus* (disrupted wing radial vein) in males; but increases embryonic lethality level. The offspring

(F1) of flies kept on the medium with betaine ($1,3 \cdot 10^{-1}\%$ and 5%) has been shown to be less viable as compared with the control. Betaine concentration of 10% in the medium was found to be lethal for this species.

Key words: *drosophila*, methyl-enriched diet, betaine, methylation, adaptability components, expressiveness of radius incompletus trait.

Введение

На сегодняшний день известно, что процессы метилирования и деметилирования являются важными составляющими метаболизма многих биоорганических соединений, в норме протекающими практически во всех живых организмах (Колотова и др., 2004). Кроме того установлено, что эти процессы задействованы в преобразовании ксенобиотиков (Куценко, 2002).

Одна из наиболее распространенных в природе функций метилирования – участие в так называемом клеточном «иммунитете». Для бактерий, например, это один из элементов системы распознавания «свой-чужой», что позволяет клетке отличать собственный генетический материал от инородных молекул и способствует поддержанию определённого уровня генетической стабильности вида (Noyer-Weidner, Trautner, 1993). Аналогичная функция сохраняется и у эукариот. Так, известно, что стабильное подавление транскрипции интегрированных вирусных последовательностей и транспозонов, препятствующее дальнейшему их распространению по геному, в клетках человека и грызунов происходит посредством метилирования (Barlow, 1993; Bestor, Tycko, 1996), а у мышей при помощи этого механизма часто происходит инактивация трансгенов (Sasaki et al., 1993). Однако у эукариот роль метилирования не ограничена защитой клетки от потенциально опасной ДНК. Предполагают, что в ходе эволюции при усложнении генома в ряду от низших эукариот к высшим имеет место функциональная переориентация системы метилирования (Bird, Tweedie, 1995; Bird, 1995; Bird et al., 1995). Если у беспозвоночных она в основном сводится к подавлению активности потенциально опасных последовательностей ДНК, у позвоночных другим ее назначением становится стабильная репрессия собственных генов (например, гены инактивированной X-хромосомы, импринтированные гены). В таком случае метилирование выступает в роли компенсаторного механизма организации всей ДНК сложных геномов в транскрипционно активные и неактивные области, в связи с чем наличие метилирования становится необходимым условием нормальной регуляции экспрессии генов в онтогенезе.

Кроме того, многие белки (актин, миозин, рибосомальные белки и др.) подвергаются метилированию посттрансляционно по остаткам лизина, аргинина и гистидина (N-метилирование), а также по остаткам глутаминовой и аспарагиновой кислот (O-метилирование). В качестве метилирующего агента обычно выступает S-аденозилметионин. Хроматин также модифицируется путем добавления посттрансляционных модификаций в гистонах, таких как присоединение метил-, ацетил-, фосфорил- и АДФ-рибозидных групп (The enzymology of posttranslational modification ..., 1980; Walsh et al., 2005).

В последнее время *Drosophila melanogaster* стала активно использоваться в исследовании вопросов, связанных с эпигенетической регуляцией активности генов, в частности метилирования генома как одного из таких механизмов. Известно, что в геноме дрозофилы закодированы белки семейства ДНК-метилтрансфераз (Hung et al., 1999; Tweedie et al., 1999). Метилирование ДНК можно обнаружить на всех этапах развития *D. melanogaster*. Метилирование ДНК у дрозофилы преобладает во время раннего эмбрионального развития и уменьшается на более поздних этапах (Reddy et al., 2003). В геноме *D. melanogaster* обнаружен метилированный С (цитозин), доля которого у взрослых мух составляет 0,05–0,1 %, в отличие от млекопитающих, для которых она составляет 2–10 %. Высококонсервативная ДНК-метилтрансфераза второго типа – Dnmt2 (фермент, обнаруженный у дрозофилы) обладает слабой, по сравнению с другими ДНК-метилтрансферазами, активностью и метилирует в большей степени CpT и CpA, чем CpG (Dnmt3 млекопитающих тоже может метилировать CpT и CpA, хотя и предпочитает CpG). Мутанты по гену Dnmt2 *D. melanogaster* жизнеспособны. Установлено, что dDnmt2 – полипептид, экспрессирующийся в организме *D. melanogaster*, гомологичен карбоксильному концу, каталитической области ДНК-метилтрансферазы позвоночных, и бактериальному dcm ферменту (Hung et al., 1999; Tweedie et al., 1999). Аналог dDnmt2 также существует в геноме млекопитающих (Okano et al., 1998; Yoder, Bestor, 1998; Dong et al., 2001). Несмотря на интенсивные исследования метилирования у дрозофилы, его функциональное значение для контроля макропризнаков, особенно сложных количественных адаптивно значимых, остается неопределённым. В связи с вышесказанным и была определена цель настоящего исследования: изучить изменение ряда количественных признаков, характеризующих приспособленность разных линий *D. melanogaster*, в связи с метил-обогащённой диетой. В качестве донора метильных групп

использовали триметилглицин (бетаин) – соединение, для которого неоднократно доказано его участие в процессах метилирования-деметилирования (Barak, Tuma, 1983; Hoffman, 1985; Barak et al., 1996; Zeisel, 2009; Pajares, Pérez-Sala, 2006; Lever, Slow, 2010).

Материалы и методы

В качестве материала для исследования использовали неселектированную линию *D. melanogaster* дикого типа Canton-S (C-S) и мутантную линию *radius incompletus* (*ri*) из коллекции кафедры генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Исследуемый ген *ri* локализован в хромосоме 3 в локусе 3–47.0 (Lindsley, Grell, 1968). Нормальный аллель этого гена (*ri*⁺) обеспечивает формирование полноценной радиальной жилки крыла (рис. 1, А; показано стрелкой), а мутация *ri* прерывает жилку (рис. 1, Б; показано стрелкой), разделяя её на два фрагмента – проксимальный и дистальный (Ратнер, Васильева, 1987; Васильева, 2005). Размеры фрагментов представляют собой удобные, легко измеримые количественные признаки, дающие существенный отклик на отбор и зависящие от температуры. Мутантный аллель *ri* в гомозиготе обладает 100%-ной пенетрантностью и имеет сильно варьирующую экспрессивность, которая, по-видимому, контролируется несколькими системами генов-модификаторов (Васильева, 1984).

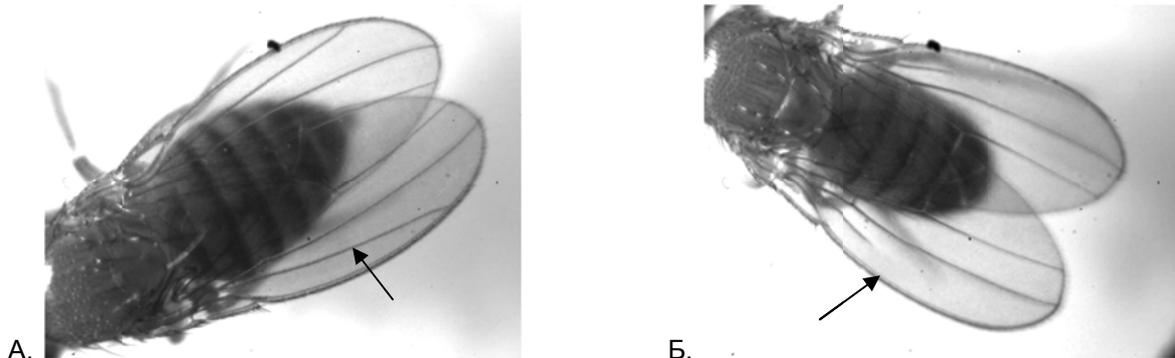


Рис. 1. Радиальная жилка крыла дрозофилы в норме (А) и при генной мутации *radius incompletus* (Б)

Линия *radius incompletus* (*ri*), использованная в исследовании, получена сотрудником кафедры генетики и цитологии Н.С.Филипоненко из исходной линии *st ri* с помощью системы скрещиваний с использованием линии-балансера по хромосомам 2 и 3 (*CyO/Pin;Ly/TM3*). Полученная линия характеризуется стабильным фенотипическим проявлением признака *ri*: наличием только проксимального участка радиальной жилки крыла (рис. 1, Б).

В качестве донора метильных групп использовали биологически активную добавку Betaine (Aroma-VitaTM) (далее по тексту: бетаин) производства Финляндии (официальный дистрибьютор на территории Украины – ЧП Резник (Резник Роман Владимирович)). Синонимы: триметилглицин, 2-(Trimethylammonio) ethanoic acid, Trimethylammonioacetate, Glycine Betaine, Trimethylbetaine, Trimethylglycocol, Abromine, Glycylbetaine, Охунеурин. Данная биологически активная добавка представляет собой чистый бетаин – порошок коричневатого цвета, легко растворимый в теплой воде при перемешивании. Безопасность применения препарата у детей в возрасте до 14 лет, беременных и кормящих женщин, животных не установлена. Побочное действие применения не установлено. Нетоксичный. Рекомендуемая производителем дозировка: внутрь – дети до 3 лет: начальная доза 100 мг/кг/сут; дети старше 3 лет и взрослые: 6 г/сут в 2 приема. Используется также в качестве кормовой добавки в животноводстве: с водой в концентрации 0,5–1 г/л; с кормом – 500–1500 г/т (концентрация $5 \cdot 10^{-2}$ – $1,5 \cdot 10^{-1}$ %) (Кирилов и др., 2004).

Аналогичный по химическому составу (чистый триметилглицин) лекарственный препарат используется в комплексной терапии гомоцистинурии (Daily Med Current ...) и ряда других заболеваний, в том числе онкологического характера (Farber, Ichinose, 1958; Xu et al., 2009).

Для проведения первой серии экспериментов – установления действующих концентраций бетаина в среде для дрозофилы – были подобраны концентрации с учетом дозировки в качестве кормовой добавки для животных. Бетаин добавляли в питательную среду (скармливали личинкам) в такой дозировке:

- 1 группа: 0,02 мг/150 г питательной среды (концентрация – $1,3 \cdot 10^{-5}$ %);
- 2 группа: 0,2 мг/150 г питательной среды (концентрация – $1,3 \cdot 10^{-4}$ %);

3 группа: 2 мг/150 г питательной среды (концентрация – $1,3 \cdot 10^{-3}\%$);
4 группа: 20 мг/150 г питательной среды (концентрация – $1,3 \cdot 10^{-2}\%$);
5 группа: 200 мг/150 г питательной среды (концентрация – $1,3 \cdot 10^{-1}\%$);
контрольная группа: добавку в среду не получала.

Среду готовили путём последовательного десятикратного разведения раствора с концентрацией $1,3 \cdot 10^{-1}\%$.

Для проведения второй серии экспериментов использовали повышенные концентрации – 5% и 10%.

Исследовали такие основные компоненты приспособленности как плодовитость, смертность на стадии куколки, жизнеспособность, относительная приспособленность, соотношение полов, доля семей без потомства, уровень доминантных летальных мутаций на ранних стадиях эмбриогенеза (ДЛМ), а также экспрессивность признака *гі*. **Плодовитость** линии определяли как среднее количество особей, доживших до стадии куколки (по числу пупариев) в потомстве одной родительской пары. Для этого виргинных самок и самцов каждой экспериментальной группы помещали в пробирки со средой (2 мл) в количестве 2 ♀ и 2 ♂. Период яйцекладки составил 5 суток. Затем родительских особей изымали. Фиксировали общее количество потомков на стадии куколки. Результат выражали в количестве потомков на 1 родительскую пару. **Жизнеспособность** линий определяли аналогично (Кайданов, 1979). Но учитывали общее количество имаго на одну родительскую пару. Для каждой экспериментальной группы параллельно было поставлено по 5–10 пробирок, данные по которым усредняли. Родительские особи были выбраны в коллекции случайным образом. Заметим, что некоторые авторы применяют иные термины для обозначения данного признака, например, «выход имаго» (Журавльова та ін., 2002), «плодовитость» (Левчук, Тоцький, 1998; Рагог и др., 1998). Мы в своей работе руководствовались определением (Hirsh, 1967, p.6) жизнеспособности как вероятности доживания особей с определённым генотипом до репродуктивного возраста. **Смертность на стадии куколки** оценивали по количеству (в процентах от общего количества пупариев) невышедших (погибших) на момент завершения периода выхода имаго из пупариев в потомстве двух родительских пар. **Относительную приспособленность** особей рассчитывали для каждой опытной группы как отношение среднего числа потомков от одной пары особей данной опытной группы к среднему числу потомков от одной пары особей контрольной группы соответствующего поколения. **Соотношение полов** учитывали как соотношение потомков женского и мужского пола в потомстве каждой экспериментальной группы. В качестве критерия изменений, происходящих в гаметах имаго, использовали **показатель частоты доминантных летальных мутаций (ДЛМ) на ранних стадиях эмбриогенеза**. Для этого виргинных имаго разделяли по полу в течение 1-х суток после вылета и выдерживали отдельно до половозрелого возраста (трое суток) на временной среде. Затем самцов и самок помещали вместе на 12 часов для спаривания. Осеменённых самок помещали в чашки Петри (d=4 см) с временной средой в количестве 5-ти штук на чашку на 8 часов для получения кладок яиц. По истечении заданного времени подсчитывали яйцепродукцию. Учет проводили при помощи бинокля МБС-10. Затем полученные кладки яиц помещали в термостат (t=23°C) на 48 часов. По истечении заданного времени проводили учёт доминантных летальных мутаций по следующим параметрам: белые яйца – ранние летали (первые 6–9 часов эмбрионального развития); жёлтые и коричневые – поздние летали (Тихомирова, 1990; Проблемы генетики в исследованиях..., 1977). Частоту доминантных летальных мутаций определяли как отношение числа неразвившихся яиц к общему числу яиц. Для каждого варианта эксперимента было выполнено по 5 измерений. **Экспрессивность количественного признака *гі*** оценивали по отношению длины проксимального участка радиальной жилки крыла к проекции её полной длины. Измерение осуществляли на фотографиях имаго, выполненных с помощью стереоскопического микроскопа NTX-20, цифровой камеры Digital EyePiece и программного обеспечения Image Analyse (Glory™). Обработка фотографий производилась с помощью программного обеспечения ImageJ, а вычисления – Nomacsoft XQR2. Результат выражался в долях. Следует уточнить, что экспрессивность мутантного признака тем выше, чем короче присутствующий проксимальный фрагмент и чем меньше результирующее соотношение.

Все показатели учитывали в двух последовательных поколениях (F0 и F1): F0 – особи, непосредственно получавшие добавку в питательную среду; F1 – потомство особей, получавших добавку бетаина, но развивающееся на стандартной среде.

Результаты были проанализированы при помощи статистических методов. В первой серии экспериментов случайным образом из 209 пар было отобрано 22 пары в контрольную, а остальные 187 – в опытные группы. Поскольку группы имели численность до 30 дат, проверку на нормальность в первом и во втором поколении осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W). Оценивали

среднее значение каждого показателя и его ошибку, дисперсию и стандартное отклонение. Влияние фактора на показатели оценивали при помощи непараметрического дисперсионного анализа (критерий Краскела-Уоллиса – H). Для анализа связи между концентрацией бетаина в среде и компонентами приспособленности использовался коэффициент корреляции рангов Спирмена (r_s) и регрессионный анализ. Соответствие соотношения полов теоретически ожидаемому (1:1) устанавливали методом χ^2 (Атраментова, Утевская, 2008). Для проведения второй серии экспериментов из каждой родительской линии были случайным образом отобраны по 40 пар особей. Из них по 20 пар каждой линии составили контрольные группы, а по 20 – опытные. Кроме вышеуказанных методов статистического анализа, для оценки влияния различных факторов на экспрессивность признака fi использовали дисперсионный анализ количественных признаков. Статистический анализ выполнен с использованием пакетов программного обеспечения Microsoft Office Excel 2003 и Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов, при определении действующих концентраций бетаина, были выявлены следующие изменения показателя плодовитости линии дикого типа на протяжении двух поколений развития (табл. 1). Во всех группах, кроме 1^{ой} (минимальная концентрация), отмечено снижение изучаемого показателя при развитии особей на среде, содержащей бетаин (F0). В следующем поколении среднее количество потомков от одной родительской пары значительно не отличается от контрольной группы.

Таблица 1.
Изменения показателя «плодовитость» линии Canton-S в связи с метил-обогащенной диетой

Группа (концентрация бетаина)	F0				F1			
	n	$\bar{x} \pm S_x$	S^2	S	n	$\bar{x} \pm S_x$	S^2	S
Контроль (0)	22	55,55±9,35	1923,33	43,86	5	29,80±2,19	24,08	4,91
Группа 1 ($1,3 \cdot 10^{-5}$)	15	87,13±13,34	2669,55	51,67	-	-	-	-
Группа 2 ($1,3 \cdot 10^{-4}$)	47	32,29±5,14	1240,29	35,22	9	22,72±3,81	130,63	11,43
Группа 3 ($1,3 \cdot 10^{-3}$)	46	40,93±5,81	1550,33	39,37	11	20,41±2,63	75,94	8,71
Группа 4 ($1,3 \cdot 10^{-2}$)	47	38,63±5,55	1447,41	38,04	16	21,69±2,62	109,43	10,46
Группа 5 ($1,3 \cdot 10^{-1}$)	32	23,67±4,95	783,61	27,99	13	25,50±2,84	104,54	10,22

Анализируя результаты, можно сделать вывод, что максимальная концентрация оказывает наибольшее угнетающее действие на особей, развивающихся в среде с бетаином, в связи с чем до стадии куколки доживает около 50%. Минимальная концентрация, наоборот, оказывает стимулирующее влияние. Для промежуточных концентраций ($1,3 \cdot 10^{-4}$ – $1,3 \cdot 10^{-2}$) характерно умеренное угнетающее действие бетаина. При этом изменяются не только абсолютные значения показателя ($\bar{x} \pm S_x$), но и его вариабельность (S^2 , S). Так, изменчивость в опытной группе, получавшей добавку в минимальной концентрации, гораздо больше, по сравнению со всеми остальными группами, включая контрольную. С другой стороны, в опытной группе, получавшей добавку в максимальной концентрации, наблюдается значительно более низкий уровень изменчивости. На наш взгляд, это может свидетельствовать, о том, что с повышением концентрации бетаина в среде происходит более интенсивная гибель особей на предкуколических стадиях развития (эмбриональной и личиночной), что, в свою очередь, позволяет предполагать токсическое действие высоких концентраций бетаина на данный вид, хотя ранее его токсического действия на другие виды животных выявлено не было. Это предположение отчасти подтверждают данные, полученные по плодовитости особей, выживших на среде с бетаином. При выращивании потомства этих особей на стандартной среде значимых различий по данному показателю в контрольной и опытных группах не наблюдается. Т.е. существенных аномалий, влияющих на плодовитость, в гаметам особей, выживших на среде, содержащей бетаин, не происходит.

При действии бетаина наблюдаются изменения показателя «смертность на стадии куколки», среди особей, развивающихся на среде с добавкой (табл. 2). Во второй, третьей и пятой опытных группах количество особей, погибающих во время метаморфоза, больше по сравнению с контрольной группой. Четвёртая опытная группа значимо не отличается от контроля по данному показателю. Исключение составляет первая опытная группа (минимальная концентрация добавки в среде), где

доля летальных куколок меньше по сравнению с контрольной. Следует отметить, что добавление бетаина в среду в концентрациях $1,3 \cdot 10^{-4}$ – $1,3 \cdot 10^{-1}$ приводит к увеличению изменчивости групп по данному показателю, по сравнению с контрольной, в то время как минимальная концентрация, наоборот, способствует её снижению. Смертность на стадии метаморфоза среди потомков особей, получавших добавку бетаина (F1), от контроля не отличается. Т.е., как и при анализе плодовитости, можно предположить, что в гаметях особей, выживших на среде, содержащей бетаин, не происходит существенных аномалий, сказывающихся на работе генов, обуславливающих метаморфоз.

Таблица 2.
Изменение показателя «смертность на стадии куколки» линии Canton-S в связи с метил-обогащенной диетой

Группа (концентрация бетаина)	F0				F1			
	n	$\bar{x} \pm S_x$	S^2	S	n	$\bar{x} \pm S_x$	S^2	S
Контроль (0)	22	10,40±2,02	89,68	9,47	5	18,32±2,26	25,61	5,06
Группа 1 ($1,3 \cdot 10^{-5}$)	15	6,44±1,49	33,50	5,79	-	-	-	-
Группа 2 ($1,3 \cdot 10^{-4}$)	47	24,59±4,07	778,49	19,89	9	16,78±4,12	73,63	8,58
Группа 3 ($1,3 \cdot 10^{-3}$)	46	14,04±2,65	323,92	27,90	11	14,86±4,83	58,40	7,64
Группа 4 ($1,3 \cdot 10^{-2}$)	47	10,24±1,93	175,78	18,00	16	16,25±3,26	67,23	8,20
Группа 5 ($1,3 \cdot 10^{-1}$)	32	17,45±3,52	395,46	13,26	13	20,81±2,16	67,23	8,20

Анализ изменений жизнеспособности линии в связи с добавлением в среду метилирующего агента показал (табл. 3), что в случае использования максимальной концентрации (из диапазона исследованных) количество особей, которые доживают до стадии имаго, снижается более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Действие минимальной концентрации, напротив, приводит к увеличению жизнеспособности особей относительно контрольной группы (примерно в 2 раза).

Таблица 3.
Изменение показателей «жизнеспособность» и «относительная приспособленность» линии Canton-S в связи с метил-обогащенной диетой

Группа (концентрация бетаина)	F0					F1				
	n	$\bar{x} \pm S_x$	S^2	S	w	n	$\bar{x} \pm S_x$	S^2	S	w
Контроль (0)	22	48,82±8,58	1620,61	40,26	1	5	24,50±2,46	30,25	5,50	1
Группа 1 ($1,3 \cdot 10^{-5}$)	15	80,53±12,58	2372,84	48,71	1,65	-	-	-	-	-
Группа 2 ($1,3 \cdot 10^{-4}$)	47	28,18±4,93	1141,36	33,78	0,58	9	16,78±2,86	73,63	8,58	0,68
Группа 3 ($1,3 \cdot 10^{-3}$)	46	36,96±5,49	1387,58	37,25	0,76	11	14,86±2,30	58,40	7,64	0,61
Группа 4 ($1,3 \cdot 10^{-2}$)	47	34,89±5,22	1281,46	35,80	0,71	16	16,25±2,05	67,23	8,20	0,66
Группа 5 ($1,3 \cdot 10^{-1}$)	32	19,97±4,49	646,14	25,42	0,41	13	20,81±2,27	67,23	8,20	0,85

Причем это увеличение обусловлено как большим количеством особей, доживающих до стадии куколки (табл. 1), так и более низким уровнем смертности во время метаморфоза (табл. 2). Для промежуточных концентраций ($1,3 \cdot 10^{-4}$ – $1,3 \cdot 10^{-2}$) характерно умеренное угнетающее действие на данный показатель. Отметим также, что, как и в случае показателя плодовитости, минимальная концентрация бетаина в среде вызывает всплеск изменчивости внутри соответствующей группы, в то время как максимальная концентрация приводит к её уменьшению. Это может также отражать увеличение уровня смертности особей на всех предимагинальных стадиях развития в связи с повышением концентрации бетаина в среде. В потомстве особей, содержащихся на среде с бетаином (F1), также отмечается отдаленный эффект – умеренное (в среднем на 30%) снижение жизнеспособности по сравнению с контрольной группой (в отличие от ранее обсуждаемых показателей, для которых аналогичного эффекта не наблюдалось).

В табл. 3 показано также изменение относительной приспособленности (w) линии дикого типа вследствие действия различных концентраций бетаина. Если говорить о том поколении, которое проходит весь цикл развития на среде с бетаином, то можно отметить, что добавление агента в среду в концентрации $1,3 \cdot 10^{-4}$ – $1,3 \cdot 10^{-1}$ приводит к снижению относительной приспособленности. В случае же действия минимальной концентрации относительная приспособленность, наоборот, повышается. Что касается потомков этих особей, уровень их относительной приспособленности несколько снижен по

сравнению с контролем.

Все полученные данные проверяли на нормальность распределения (табл. 4). Так, в F0 распределение данных показателя плодовитости для контрольной и 1 опытной (минимальная концентрация агента) групп соответствует нормальному, в отличие от 2–5-ой опытных групп. В F1 в контрольной и 4-ой группах распределение не соответствует нормальному, а в остальных – наоборот.

Таблица 4.

Проверка на нормальность распределений (критерий Шапиро-Уилка)

Группа (концентрация бетаина)	Плодовитость F0		Плодовитость F1		Смертность на стадии куколки (%) F0		Смертность на стадии куколки (%) F1		Жизнеспособность F0		Жизнеспособность F1	
	W	p	W	p	W	p	W	p	W	p	W	p
Контроль (0)	0,93	0,13	0,67	0,001	0,89	0,02	0,79	0,06	0,93	0,13	0,74	0,03
Группа 1 ($1,3 \cdot 10^{-5}$)	0,89	0,07	-	-	0,88	0,04	-	-	0,90	0,104	-	-
Группа 2 ($1,3 \cdot 10^{-4}$)	0,83	0,001	0,92	0,36	0,82	0,001	0,95	0,74	0,81	0,001	0,92	0,41
Группа 3 ($1,3 \cdot 10^{-3}$)	0,88	0,001	0,90	0,19	0,70	0,001	0,99	0,99	0,87	0,001	0,97	0,91
Группа 4 ($1,3 \cdot 10^{-2}$)	0,86	0,001	0,82	0,005	0,73	0,001	0,92	0,18	0,84	0,001	0,89	0,07
Группа 5 ($1,3 \cdot 10^{-1}$)	0,80	0,001	0,95	0,53	0,76	0,001	0,98	0,95	0,76	0,001	0,91	0,16

Анализ распределения данных по показателю смертности на стадии куколки показал, что в F0 только в 1 группе (минимальная концентрация бетаина) характерно нормальное распределение, а во всех других – распределение не соответствует нормальному. В F1 для всех групп характерно нормальное распределение признака. Что же касается показателя жизнеспособности, установлено, что в F0 для контрольной и первой опытной групп характерно нормальное распределение, а для всех других – распределение, не соответствующее нормальному. Распределение во всех группах F1 соответствует нормальному. Изменение типа распределения, на наш взгляд, также может свидетельствовать в пользу отбора определённых генотипов под действием фактора избытка доступных метильных групп в питательной среде.

При помощи непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса (аналог дисперсионного анализа) было доказано, что в F0 концентрация бетаина в питательной среде влияет ($N=17,7$; $p=0,003$) на плодовитость *D. melanogaster*. В то же время имаго, выжившие на среде с различной концентрацией бетаина, по плодовитости (F1) (в стандартных условиях) не отличаются от контрольной группы ($N=4,54$; $p=0,338$). Аналогично, показано влияние изучаемого фактора на показатель «смертность на стадии куколки» в F0 ($N=11,08$; $p=0,049$). В F1 ($N=2,72$; $p=0,605$) анализ результатов подтвердил, что данный показатель в опытных группах не отличается от контрольных значений. Добавление бетаина в заданных концентрациях в питательную среду *D. melanogaster* также влияет и на жизнеспособность особей ($N=17,910$; $p=0,003$). Потомки же особей, получавших различные дозы бетаина, но развивающиеся на стандартной среде, по жизнеспособности не отличаются от контрольной группы ($N=7,404$; $p=0,116$).

Увеличение плодовитости и жизнеспособности в 1-ой опытной группе можно объяснить тем, что малые дозы бетаина в среде могли простимулировать яйцекладку у родителей опосредованно через изменение метаболизма дрожжей, которые синтезируют необходимые для жизнедеятельности и нормального гаметогенеза дрозофилы предшественники гормонов (Бондаренко и др., 1989). С другой стороны, можно предположить, что минимальная доза оказывает стимулирующее действие на организм личинки, развивающейся в среде с бетаином, вследствие чего та часть особей, которая в норме погибает в контрольной группе, в 1 группе доживает до стадии куколки. Снижение же количества особей, доживающих до той или иной стадии, на метил-обогащенной диете можно объяснить с позиции действия бетаина как стресс-фактора. Подобные результаты были установлены при изучении воздействия других биологически активных веществ, например кофеина (Горенская, 2010). Также для интерпретации полученных данных можно рассматривать эпигенетическое влияние бетаина на функции организма, т.е. влияние избытка доступных метильных групп на регуляцию работы генов, активных на ранних стадиях онтогенеза дрозофилы.

Для выяснения, соответствует ли соотношение полов у исследуемого объекта *Drosophila melanogaster* теоретически ожидаемому, использовали критерий χ^2 . При сравнении опытных значений критерия с табличным ($\chi^2_{\text{табл}}=3,841$) не было установлено значимых различий между экспериментально полученными соотношениями полов в каждой группе и теоретически ожидаемыми. Следовательно, можно сделать вывод, что добавление бетаина в разной концентрации в питательную среду не влияет на соотношение полов *Drosophila melanogaster*, как в поколении, которое проходит полный цикл развития на среде с добавкой, так и в следующем поколении. Иными словами, бетаин в заданных концентрациях, по всей видимости, не обладает дифференциальным (пол-специфическим) летальным действием.

Анализ связи между концентрацией бетаина в среде и компонентами приспособленности, распределение которых не подчиняется нормальному закону, проводили с помощью коэффициента корреляции рангов Спирмена. В поколении, непосредственно употреблявшем бетаин в составе пищи, получены такие результаты: между концентрацией добавки в среде и показателями плодовитости и жизнеспособности существует обратно пропорциональная зависимость ($r_s=-0,77$; $p=0,07$ для обоих показателей): чем больше концентрация бетаина в питательной среде (из исследованных вариантов), тем меньше плодовитость и жизнеспособность линии. Полученные значения коэффициентов корреляции, однако, не позволяют говорить о строгой линейности данной зависимости. Между концентрацией добавки в среде и показателем смертности на стадии куколки значимой корреляционной связи не обнаружено. Статистическая незначимость коэффициентов корреляции может свидетельствовать либо об отсутствии функциональной связи между данными показателями, либо о её существенной нелинейности (Экспериментальная психология, 2000). Так, например, более детальный анализ зависимости плодовитости линии от концентрации бетаина в среде показал, что, скорее всего, она носит полиномиальный характер (рис. 2), и в соответствии с таким типом зависимости летальной для данного вида насекомых должна быть концентрация приблизительно $1,3 \cdot 10^1\%$, что было проверено во второй серии экспериментов. Зависимость жизнеспособности линии от концентрации метилирующего агента в среде, по-видимому, будет иметь не менее сложный характер.

В связи с тем, что в потомстве особей, развивавшихся на среде с бетаином (F1), ни для одного из изучаемых показателей не было доказано влияния концентрации бетаина, на наш взгляд, оценить достоверно связи этих показателей с действующей концентрацией агента не представляется возможным.

На следующем этапе работы было изучено действие более высоких (5% и 10%) концентраций бетаина на показатели приспособленности линий *D. melanogaster* и проанализированы изменения экспрессивности признака ri в связи с метил-обогащенной диетой.

Установлено достаточно сильное угнетающее действие обеих концентраций на развитие особей (рис. 3). Следует отметить, что разные генотипы реагируют на присутствие бетаина в среде сходным образом. При этом более чувствительной к действию фактора оказалась мутантная линия, так как изначально именно она характеризовалась более высоким значением показателя жизнеспособности. Отдельно следует отметить, что 10 %-ная концентрация оказалась летальной для обеих использованных линий.

Чтобы установить причину отсутствия потомства у особей на среде с концентрацией бетаина 10% (родительские особи не откладывают яйца на среде или из отложенных яиц не развивается потомство), были проанализированы кладки яиц, отложенных осемененными самками из родительских линий на среду с концентрацией бетаина 10% (аналогично методике учёта ДЛМ на ранних стадиях онтогенеза). Результаты показали (табл. 5), что, как для линии C-S, так и для линии ri справедливы оба предположения. С одной стороны, существенно снижается количество отложенных яиц на момент времени учёта, а с другой – те личинки, которые всё-таки выходят из яиц, погибают на стадии первого возраста (рис. 4).

Снижение яйцоткладки после воздействия может быть сигналом зачаткового отбора, элиминации клеток в ходе гаметогенеза (Проблемы генетики в исследованиях..., 1977). Причем, следует учитывать, что в ооцитах 7–14 стадий возможное участие отбора в его классической форме – элиминации крупных хромосомных повреждений – является минимальным, так как эти клетки уже не делятся, и мейотическое расхождение хромосом происходит после оплодотворения (Илясов, Шварцман, 1974). И, по-видимому, более вероятным будет механизм зачаткового отбора, связанный с резорбцией ооцитов за счет повреждений вителлогенеза, в результате блокады синтеза ДНК в питающих клетках. Такой эффект ранее был показан преимущественно для сильных мутагенов.

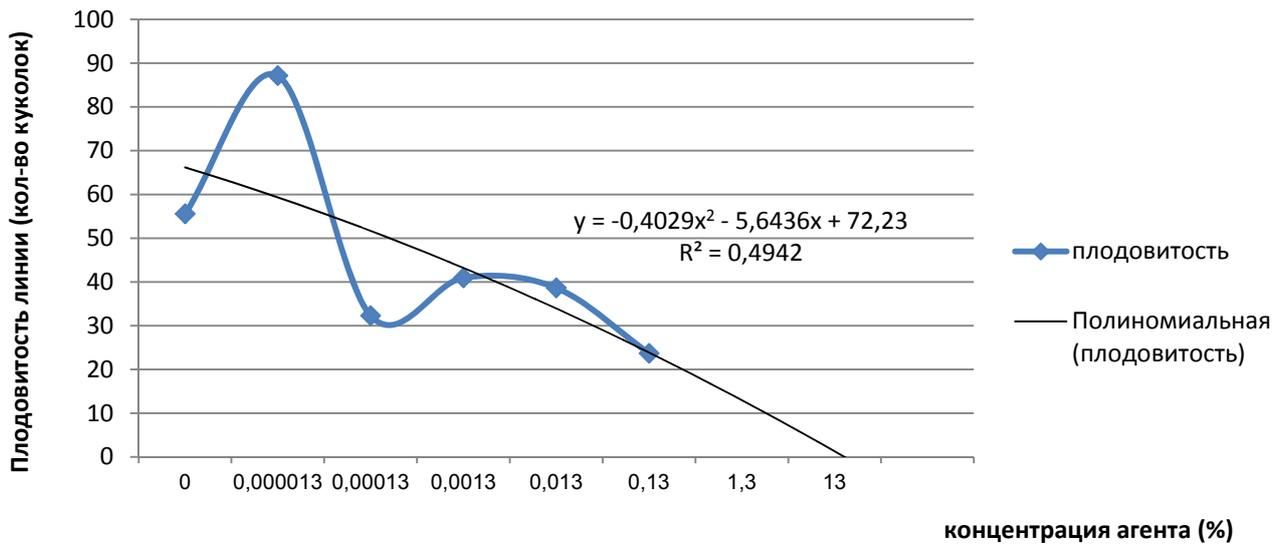


Рис. 2. Зависимость плодовитости линии дикого типа Canton-S от концентрации бетаина в питательной среде

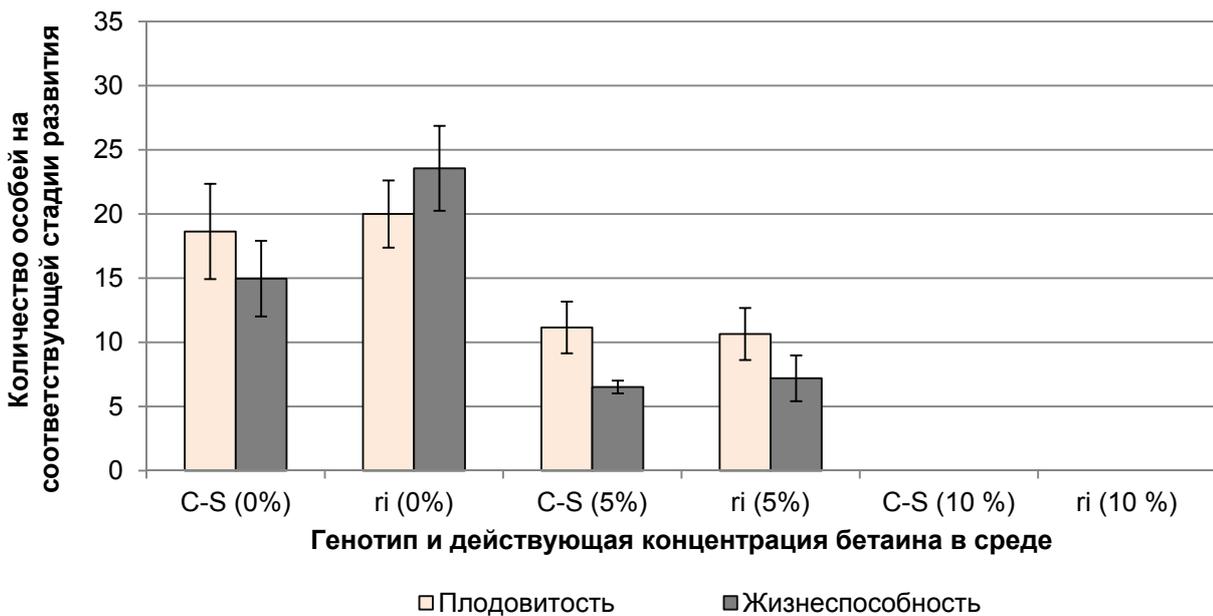


Рис. 3. Плодовитость и жизнеспособность линий в зависимости от концентрации бетаина в среде (F0)

Снижение плодовитости после воздействия, как отмечалось и выше, может указывать на возникновение стресс-реакции дрозофилы. Воздействие экстремальных факторов на имаго дрозофилы вызывает снижение деградации ювенильного гормона у самок и, как следствие, возрастание его уровня; эта гормональная реакция приводит к задержке откладки яиц (Раушенбах, 1997). Уровень яйцеоткладки может повыситься в дальнейшем или же оставаться сниженным.

Кроме того, анализ смертности на стадии куколки среди особей, получавших добавку бетаина в концентрации 5% (рис. 5), не выявил значимых различий по сравнению с соответствующими контрольными группами. Такие результаты, на наш взгляд, свидетельствуют о более жестком отборе на более ранних стадиях, особенно на стадии личинки – стадии наиболее активного потребления пищи.

Таблиця 5.
 Аналіз кладок яєц, отриманих на середі з додаванням бетаїна в концентрації 10%

Линия	Показатель	Концентрация бетаина	
		0 %	10%
C-S	Яйцепродукция	186,44±43,26	6,4±1,9
	Ранние ДЛМ (%)	3,7±1,8	21,6±13,5
	Поздние ДЛМ (%)	0,06±0,06	0±0,001
	Суммарный уровень ДЛМ (%)	3,8±1,9	21,6±13,5
ri	Яйцепродукция	140,25±30,09	14,25±3,61
	Ранние ДЛМ (%)	8,99±2,28	19,5±4,4
	Поздние ДЛМ (%)	0,27±0,23	0±0,001
	Суммарный уровень ДЛМ (%)	9,26±2,28	19,5±4,4

Примечание: повышение доли неразвившихся яиц (ДЛМ) под действием 10%-ной концентрации связано, скорее всего, с низкой яйцепродукцией в целом. Абсолютные значения неразвившихся яиц в экспериментальных группах не велики (0–5 шт. на 1 чашку).



Рис. 4. Потомство (личинки первого возраста), развивающееся на среде с 10%-ной концентрацией бетаина (стрелками обозначены неподвижные, предположительно мёртвые, личинки; белая личинка в центре – подвижная) (ув. ×26). Размеры личинок сопоставимы с размерами яиц

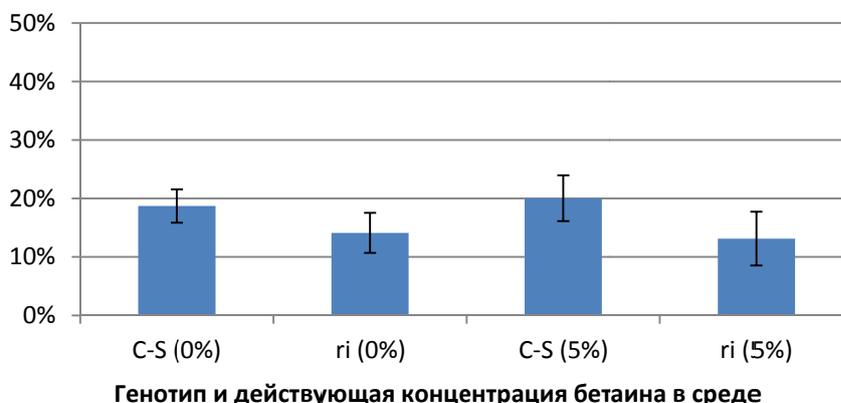


Рис. 5. Смертность на стадии куколки в зависимости от концентрации бетаина в среде (F0)

У особей мутантної лінії, що пройшли повний цикл розвитку на середі з бетаїном (5%), досліджували проявлення мутації *ri*. Аналіз змін експресивності признака *ri* в зв'язі з дією бетаїну (рис. 6) показав, що для самок цієї лінії характерна білатеральна асиметрія ступеня варіабельності експресивності вивчаемого признака. При цьому більша змінчивість спостерігається для експресивності признака на лівому крилі самок. У самців мутантний фенотип виражений ярче (т.е. присутній проксимальний ділянку радіальної жилки крила коротше; експресивність мутантного признака вище). При додаванні в середу бетаїну в кожному вивчаємому класі спостерігається зниження варіабельності данного признака. При цьому ступінь вираженості признака у самців і у самок стає однаковою (а саме за рахунок того, що присутній проксимальний ділянку радіальної жилки крила у самців стає довше; експресивність мутантного признака у самців зменшується). Дисперсійний аналіз підтвердив, що експресивність признака на лівому крилі залежить від статі особи ($F=6,56$; $p<0,05$), а експресивність його на правому крилі змінюється під дією бетаїну ($F=14,59$; $p<0,05$).

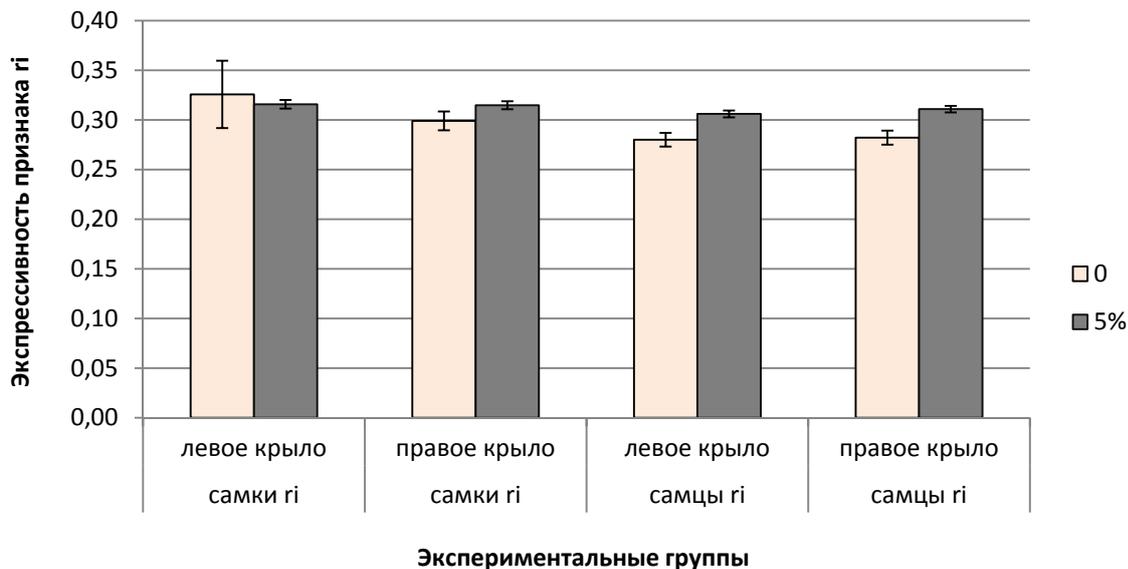


Рис. 6. Межполовые различия экспресивности признака *ri* в зависимости от действия бетаина (F0)

Поскольку данная модель оказалась чувствительной к действию метилирующего агента в заданной концентрации, она может быть использована для дальнейшего более тщательного изучения.

На следующем этапе проводили анализ отдаленных последствий употребления особями дрозофилы бетаина (5%) вместе с пищей, а именно исследовали компоненты приспособленности и экспресивность признака *ri* в потомстве имаго, прошедших полный цикл развития на среде с добавкой.

Установлено (рис. 7), что добавление в среду бетаина в концентрации 5% приводит к существенному повышению уровня ранней эмбриональной смертности среди потомства особей линии дикого типа, развивавшихся на среде с бетаином. При этом основной вклад в суммарный уровень смертности вносят ранние ДЛМ. Мутантная линия оказалась более устойчивой к действию данного фактора, но тенденция к повышению уровня смертности наблюдается и для неё. Следует отметить, что для мутантной линии отмечается значимое повышение уровня именно поздних ДЛМ, которые, как считают некоторые авторы, являются более адекватным критерием хромосомных aberrаций (Литвинова, 1977; Шварцман, 1972). Поскольку ДЛМ в целом, определяемые как отношение числа погибших эмбрионов к числу учтенных, являются сборной группой, в которую входят зиготы, погибшие как в результате повреждения генетического аппарата, так и в силу других причин, например подавления синтеза ДНК (Алексеевич и др., 1979).

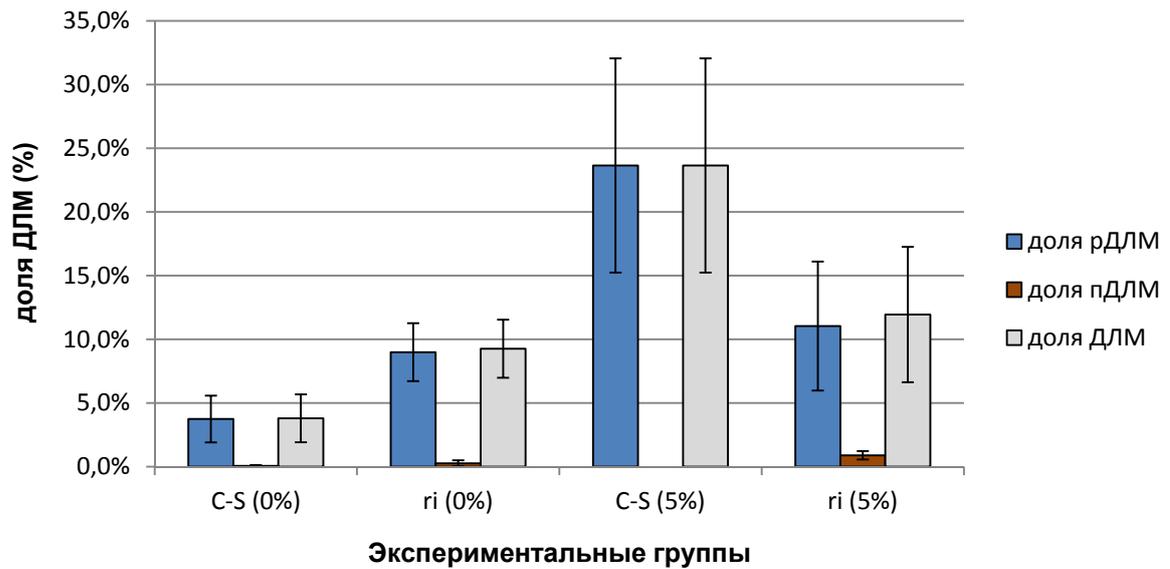


Рис. 7. Влияние бетаина на раннюю эмбриональную смертность разных линий дрозофилы (F1) (опытные варианты – кладки особей, развивавшихся на среде с бетаином, на стандартную среду)

По показателю плодовитости (рис. 8) особи линии дикого типа, выжившие на среде с бетаином, не отличаются от контрольной группы. Если учитывать, что для этой линии отмечено существенное повышение ранней эмбриональной смертности (рис. 7), то можно предположить, что в опытной группе либо повышается общее количество откладываемых самками в течение 5 суток яиц, либо происходит снижение уровня личиночной смертности. Для мутантной линии (рис. 8) отмечаются более выраженные отдаленные эффекты: до стадии куколки доживает чуть более 70% особей. Обе линии (мутантная – в большей степени) при этом характеризуются снижением жизнеспособности (рис. 8). По всей видимости, в гаметах особей, прошедших полный цикл развития на среде, содержащей бетаин в концентрации 5%, происходят изменения, способствующие не только повышению уровня ранней эмбриональной смертности, но также приводящие к гибели особей на более поздних стадиях онтогенеза.

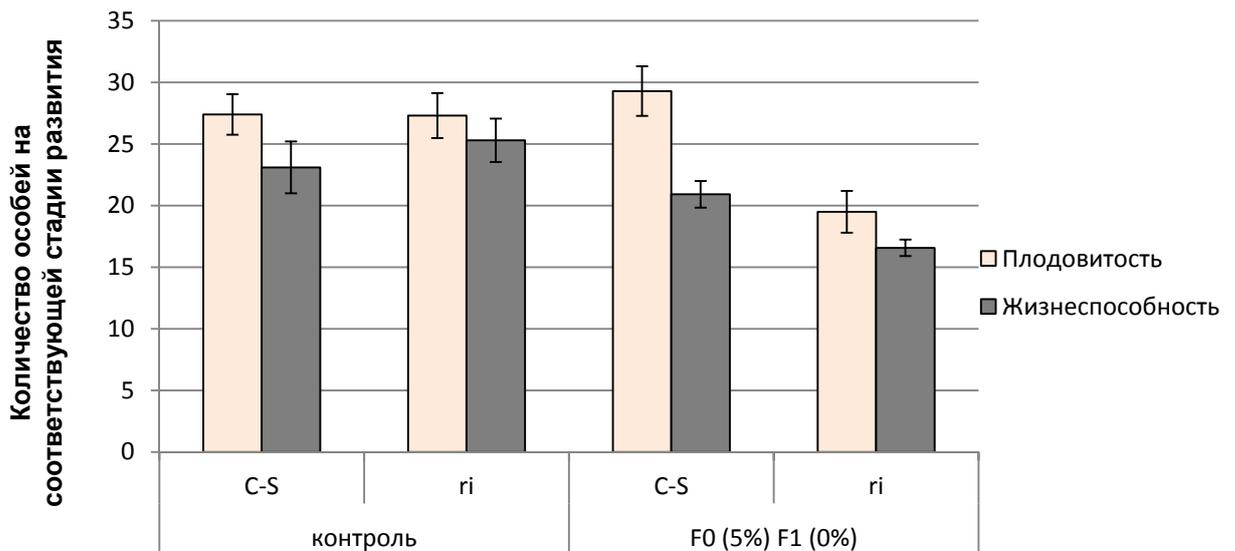


Рис. 8. Плодовитость и жизнеспособность особей, прошедших полный цикл развития на среде с бетаином (5%) – F1

Эти предположения отчасти подтверждают данные, полученные для показателя «смертность на стадии куколки» (рис. 9). Для обеих линий, в среднем, отмечается повышенный уровень гибели особей во время метаморфоза.

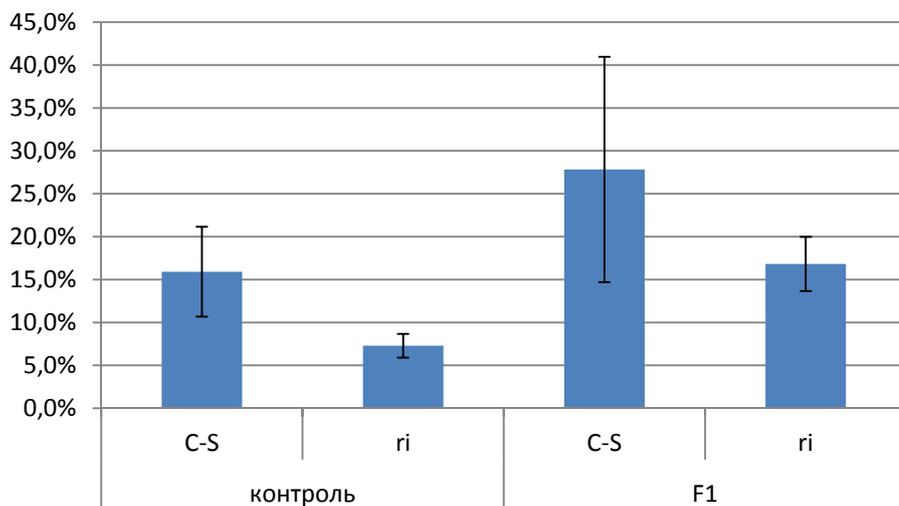


Рис. 9. Смертность на стадии куколки в потомстве особей, прошедших полный цикл развития на среде с бетаином (5%) – F1

К сожалению, в рамках данного исследования четко установить природу изменений, происходящих в гаметах особей, выживших на среде, содержащей бетаин (5%), не представлялось возможным. Однако характер используемого агента позволяет предполагать, что одной из причин может быть нарушение баланса процессов метилирования и деметилирования генома. Отметим, что ярко выраженное действие фактора на гаметы особей, содержащихся на метил-обогащенной диете, можно наблюдать как раз на тех стадиях развития потомков, на которых происходит наиболее активная смена программ экспрессии генома (ранний эмбриогенез и метаморфоз).

Анализ экспрессивности признака *ri* у потомков родителей, развивавшихся на среде с добавкой бетаина (рис. 10), не выявил резких колебаний данного показателя в связи с метил-обогащенной диетой.

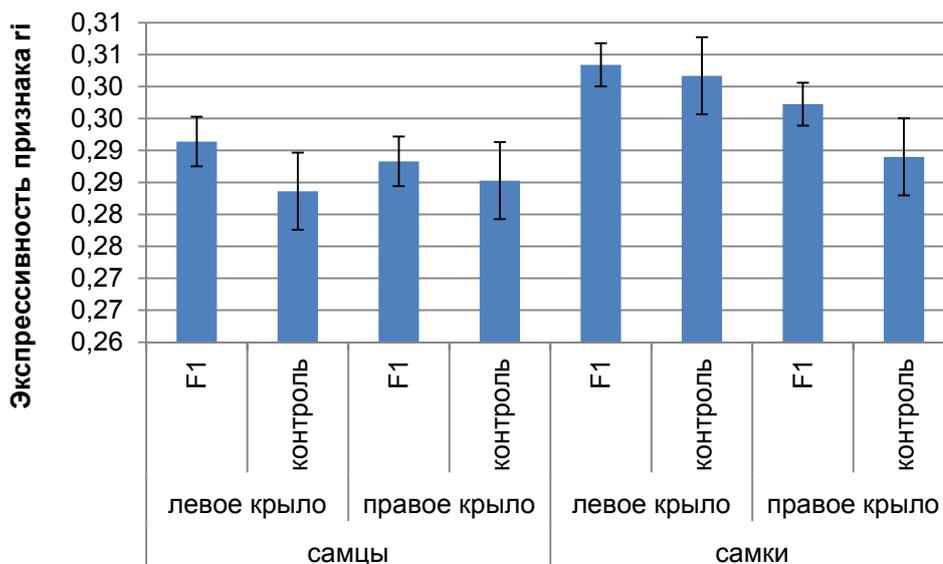


Рис. 10. Межполовые различия экспрессивности признака *ri* в потомстве особей, прошедших полный цикл развития на среде с бетаином (5%) – F1

Однако отмечаются четко выраженные межполовые различия по данному признаку, что подтверждают и результаты дисперсионного анализа ($F=9,2$; $p=0,003$). Для самцов характерна большая экспрессивность мутантного признака по сравнению с самками. Это может указывать на наличие в X-хромосоме некоего рецессивного модификатора, регулирующего экспрессивность гена *ri*, что, впрочем, нуждается в проведении дополнительных исследований.

Выводы

В ходе проведенного исследования влияния метил-обогащенной диеты на проявление количественных признаков *Drosophila melanogaster* обнаружено, что концентрация донора метильных групп бетаина в питательной среде и показатели плодовитости и жизнеспособности линии дикого типа связаны между собой обратно пропорциональной полиномиальной зависимостью. Установлено, что добавление в среду бетаина в минимальной концентрации ($1,3 \cdot 10^{-5}\%$) приводит к повышению жизнеспособности особей, увеличению количества особей, доживающих до стадии куколки и к снижению гибели особей во время метаморфоза. При добавлении агента в концентрации 5% отмечается снижение плодовитости и жизнеспособности линий, повышение уровня эмбриональной смертности и снижение экспрессивности мутантного признака *radius incompletus* (прерванная радиальная жилка крыла) у самцов. Установлена концентрация бетаина в среде, которая является летальной для данного вида – 10%. Обнаружено также снижение жизнеспособности по сравнению с контрольной группой в потомстве особей, содержащихся на среде с бетаином ($1,3 \cdot 10^{-1}\%$ и 5%). Таким образом, бетаин в различных концентрациях может быть использован в качестве регулятора численности *Drosophila melanogaster* и модулятора экспрессивности количественных признаков.

Список литературы

- Алексеевич Л.А., Барабанова Л.В., Ватти К.В. и др. Сравнительный анализ частоты возникновения индуцированных рентгеновыми лучами доминантных летальных мутаций у самок и самцов разных видов животных // Исследования по генетике. – 1979. – Вып.8. – С. 70–81. /Alekseyevich L.A., Barabanova L.V., Vatti K.V. i dr. Sravnitel'nyy analiz chastoty vozniknoveniya indutsirovannykh rentgenovymi luchami dominantnykh letal'nykh mutatsiy u samok i samtsov raznykh vidov zhyvotnykh // Issledovaniya po genetike. – 1979. – Vyp.8. – S. 70–81/
- Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии: учебник. – Горловка: «Видавництво Ліхтар», 2008. – 248с. /Atramentova L.A., Utevskaia O.M. Statisticheskie metody v biologii: uchebnik. – Gorlovka: «Vydavnytstvo Likhtar», 2008. – 248s./
- Бондаренко Л.В., Лучникова Е.М., Инге-Вечтомов С.Г. Влияние на плодовитость самок дрозофилы метаболизма стероидов в эколого-генетической системе дрожжи-дрозофила // Онтогенез. – 1989. – Т.20. – С. 141–148. /Bondarenko L.V., Luchnikova Ye.M., Inge-Vechtomov S.G. Vliyanie na plodovitost' samok drozofily metabolizma sterinov v ekologo-geneticheskoy sisteme drozhzhi-drozofila // Ontogenez. – 1989. – T.20. – S. 141–148/
- Васильева Л.А. Анализ системы генов, экспрессирующей неполную радиальную жилку крыла *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1984. – Т.20, №4. – С. 599–604. /Vasilyeva L.A. Analiz sistemy genov, ekspressiruyushchey nepolnuyu radial'nyuyu zhilku kryla *Drosophila melanogaster* // Genetika. – 1984. – T.20, №4. – S. 599–604/
- Васильева Л.А. Изменение системы жилкования крыла *Drosophila melanogaster* под действием температурного шока и селекции // Журнал общей биологии. – 2005. – Т.66, №1. – С. 68–74. /Vasilyeva L.A. Izmeneniye sistemy zhilkovaniya kryla *Drosophila melanogaster* pod deystviyem temperaturnogo shoka i selektsii // Zhurnal obshchey biologii. – 2005. – T.66, №1. – S. 68–74/
- Горенская О.В. Формирование приспособленности при хроническом действии кофеина у *Drosophila melanogaster* // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2010. – Вип.11., №905. – С. 66–76. /Gorenskaya O.V. Formirovaniye prispособlennosti pri khronicheskom deystvii kofeina u *Drosophila melanogaster* // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2010. – Vyp.11., №905. – S. 66–76/
- Журавльова Л., Страшнюк В., Шахбазов В. Вплив щільності культури на прояв ефекту гетерозису у *Drosophila melanogaster* // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2002. – Вип.35. – С. 102–109. /Zhuravlyova L., Strashnyuk V., Shakhbazov V. Vplyv shchil'nosti kul'tury na proyav efektu geterozisu u *Drosophila melanogaster* // Visnyk L'viv'skogo universytetu. Seriya biologichna. – 2002. – Vyp.35. – S. 102–109/
- Илясов Ю.И., Шварцман П.Я. Сравнительный анализ доминантных летальных мутаций при действии этиленimina и рентгеновского облучения на ооциты дрозофилы разного возраста // Химический мутагенез: Сб. научн. тр. – Л., 1974. – С. 80–98. /Ilyasov Yu.I., Shvarcman P.Ya. Sravnitel'nyy analiz dominantnykh letal'nykh mutatsiy pri deystvii etilenimina i rentgenovskogo oblucheniya na ootsity drozofily raznogo vozrasta // Khimicheskyy mutagenез: Sb. nauchn. tr. – L., 1974. – S. 80–98/
- Кайданов Л.З. Анализ генетических последствий отбора и инбридинга у *Drosophila melanogaster* // Журнал общей биологии. – 1979. – Т.60, №6. – С. 834–849. /Kaydanov L.Z. Analiz geneticheskikh posledstviy otbora i inbridinga u *Drosophila melanogaster* // Zhurnal obshchey biologii. – 1979. – T.60, №6. – S. 834–849/
- Кирилов М.П., Абдрафиков А.Р., Анисова Н.И. и др. Препараты биологически активных веществ нового поколения в составе комбикормов для сельскохозяйственных животных // «Прошлое,

- настоящее и будущее зоотехнической науки». Научные труды ВИЖа. – 2004. – Т.3, №62. – С. 300–306. /Kirilov M.P., Abdrafikov A.R., Anisova N.I. i dr. Preparaty biologicheski aktivnykh veshchestv novogo pokoleniya v sostave kombikormov dlya sel'skokhozyaystvennykh zhiivotnykh // «Proshloye, nastoyashcheye i budushcheye zootehnicheskoy nauki». Nauchnye trudy VIZha. – 2004. – Т.3, №62. – С. 300–306/
- Колотова Т.Ю., Стегний Б.Т., Кучма И.Ю. и др. Механизмы и контроль перестроек генома эукариот. – Харьков: Коллегиум, 2004. – 264с. /Kolotova T.Yu., Stegny B.T., Kuchma I.Yu. i dr. Mekhanizmy i kontrol' perestroek genoma eukariot. – Khar'kov: Kollegium, 2004. – 264s./
- Куценко С.А. Основы токсикологии. – Санкт-Петербург, 2002. [Электронный ресурс]. (<http://www.medline.ru/public/monografy/toxicology>) /Kutsenko S.A. Osnovy toksikologii. – Sankt-Peterburg, 2002. [Elektronnyy resurs]/
- Левчук Л.В., Тоцький В.М. Заміщення хромосом і пристосованість генотипів *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 1998. – Т.32, №2. – С. 42–48. /Levchuk L.V., Tots'kyi V.M. Zamishchennya khromosom i prystosovanist' genotypiv *Drosophila melanogaster* // Tsitologiya i genetika. – 1998. – Т.32, №2. – С. 42–48/
- Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле / Под ред. В.В.Хвостовой, Л.И.Корочкина, М.Д.Голубовского. – Новосибирск: Наука, 1977. – 277с. /Problemy genetiki v issledovaniyakh na drozofile / Pod red. V.V.Khvostovoy, L.I.Korochkina, M.D.Golubovskogo. – Novosibirsk: Nauka, 1977. – 277s./
- Рарог М.А., Воробьева Л.И., Кирпиченко Т.В. Динамика изменения некоторых компонентов приспособленности в онтогенезе дрозофилы // Онтогенез. – 1998. – Т.29, №1. – С. 52–56. /Rarog M.A., Vorobyova L.I., Kirpichenko T.V. Dinamika izmeneniya nekotorykh komponentov prisposoblennosti v ontogeneze drozofily // Ontogenez. – 1998. – Т.29, №1. – С. 52–56/
- Ратнер В.А., Васильева Л.А. Количественный признак у дрозофилы: генетические, онтогенетические, цитогенетические и популяционные аспекты // Генетика. – 1987. – Т.23, №6. – С. 1070–1081. /Ratner V.A., Vasilyeva L.A. Kolichestvennyy priznak u drozofily: geneticheskiye, ontogeneticheskiye, tsitogeneticheskiye i populyatsionnyye aspekty // Genetika. – 1987. – Т.23, №6. – С. 1070–1081/
- Раушенбах И.Ю. Стресс-реакция насекомых: механизм, генетический контроль, роль в адаптации // Генетика. – 1997. – Т.33, №8. – С. 1110–1118. /Raushenbakh I.Yu. Stress-reaktsiya nasekomykh: mekhanizm, geneticheskiy kontrol', rol' v adaptatsii // Genetika. – 1997. – Т.33, №8. – С. 1110–1118/
- Тихомирова М.М. Генетический анализ: Учеб. пособие. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. – 280с. /Tikhomirova M.M. Geneticheskiy analiz: Ucheb. posobiye. – L.: Izd-vo LGU, 1990. – 280s./
- Шварцман П.Я. Изучение временных особенностей летального и мутагенного действия этиленimina на половые клетки *Drosophila melanogaster*. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Л., 1972. – 25с. /Shvarcman P.Ya. Izucheniye vremennykh osobennostey letal'nogo i mutagen'nogo deystviya etilenimina na polovyye kletki *Drosophila melanogaster*. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. – L., 1972. – 25s./
- Экспериментальная психология. – СПб: Издательство «Питер», 2000. – 320с. /Eksperimental'naya psihologiya. – SPb: Izdatel'stvo «Piter», 2000. – 320s./
- Barak A.J., Beckenhauer H.C., Tuma D.J. Betaine, ethanol, and the liver: a review // Alcohol. – 1996. – Vol.13, №4. – P. 395–398.
- Barak A.J., Tuma D.J. Betaine, metabolic by-product or vital methylating agent? // Life Sci. – 1983. – Vol.32, №7. – P. 771–774.
- Barlow D.P. Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? // Science. – 1993. – Vol.260, №5106. – P. 309–310.
- Bestor T.H., Tycko B. Creation of genomic methylation patterns // Nat. Genet. – 1996. – Vol.4. – P. 363–367.
- Bird A., Tate P., Nan X. et al. Studies of DNA methylation in animals // J. Cell Sci. Suppl. – 1995. – Vol.19. – P. 37–39.
- Bird A., Tweedie S. Transcriptional noise and the evolution of gene number // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 1995. – Vol.349, №1329. – P. 249–253.
- Bird A.P. Gene number, noise reduction and biological complexity // Trends Genet. – 1995. – Vol.3. – P. 94–100.
- Daily Med Current Medication Information. [Electronic resource]. (<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=84f7c21f-d0af-4ae6-9cd5-d5af96ade329>)
- Dong A., Yoder J.A., Zhang X. et al. Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA // Nucl. Acids Res. – 2001. – Vol.29, №2. – P. 439–448.
- Farber E., Ichinose H. The prevention of ethionine-induced carcinoma of the liver in rats by methionine // Cancer Res. – 1958. – Vol.18. – P. 1209–1213.
- Hirsh J. Behavior – genetic analysis. – New York: Mc Graw–Hill, Inc., 1967. – 522p.
- Hoffman R.M. Altered methionine metabolism and transmethylation in cancer // Anticancer Res. – 1985. – Vol.5, №1. – P. 1–30.
- Hung M.S., Karthikeyan N., Huang B. et al. *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1999. – Vol.96, №21. – P. 11940–11945.

- Lever M., Slow S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism // *Clin. Biochem.* – 2010. – Vol.43, №9. – P. 732–744.
- Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. – Carnegie Just. Wash. Publ., 1968. – 627p.
- Noyer-Weidner M., Trautner T.A. Methylation of DNA in prokaryotes // *EXS.* – 1993. – Vol.64. – P. 39–108.
- Okano M., Xie S., Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – Vol.11. – P. 2536–2540.
- Pajares M.A., Pérez-Sala D. Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism? // *Cell Mol. Life Sci.* – 2006. – Vol.63, №23. – P. 2792–2803.
- Reddy M.N., Tang Lin-Ya, Lee Tai-Lin, Shen C-K.J. A candidate gene for *Drosophila* genome methylation. – 2003. [Electronic resource]. (<http://www.nature.com/ONC>)
- Sasaki H., Allen N.D., Surani M.A. DNA methylation and genomic imprinting in mammals // *EXS.* – 1993. – Vol.64. – P. 469–486.
- The enzymology of posttranslational modification of proteins / Ed. by R.B.Freedman, H.C.Hawkins. – New York: Acad. Press, 1980. – 515p.
- Tweedie S., Ng H.H., Barlow A.L. et al. Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? // *Nat. Genet.* – 1999. – Vol.4. – P. 389–390.
- Walsh C.T., Garneau-Tsodikova S., Gatto G.J., Angew Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications // *Chem. Int. Ed.* – 2005. – Vol.44. – P. 7342–7372.
- Xu X., Gammon M.D., Zeisel S.H. et al. High intakes of choline and betaine reduce breast cancer mortality in a population-based study // *FASEB J.* – 2009. – Vol.23, №11. – P. 4022–4028.
- Yoder J.A., Bestor T.H. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast // *Hum. Mol. Genet.* – 1998. – Vol.2. – P. 279–284.
- Zeisel S.H. Importance of methyl donors during reproduction // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2009. – Vol.89, №2. – P. 673S–677S.

Представлено: П.Ю.Монтвід / Presented by: P.Yu.Montvid

Рекомендовано до друку: А.В.Некрасовою / Recommended for publishing by: A.V.Nekrasova

Подано до редакції / Received: 15.09.2010.