

УДК 57.043:57.013

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ДРОЗОФИЛ ИЛИ КАК СЭКОНОМИТЬ НА СОДЕРЖАНИИ КОЛЛЕКЦИИ

© 2019 г. Л. П. Захаренко*, **, @

*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения

Российской академии наук, просп. Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

**Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

@E-mail: zakharlp@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 15.05.2017 г.

После доработки 22.10.2018 г.

Принята к публикации 21.02.2019 г.

Проведен анализ литературы по криоконсервации *Drosophila melanogaster*, коллекции которой насчитывают сотни тысяч линий. Отмечено, что криоконсервация эмбрионов *D. melanogaster* возможна лишь на 14-й стадии развития после пермеабиллизации хориона, препятствующего проникновению криопротекторов, и завершается успехом в 3% случаев. Успешная криоконсервация личинок и имаго дрозофил проведена пока только для вида *Chymomyza costata*. Установлено, что сэкономить затраты на поддержание коллекции *D. melanogaster* можно, удлинив онтогенез за счет снижения калорийности корма и температуры содержания, а также укорочения светового периода.

DOI: 10.1134/S0002332919060158

Дрозофила как объект генетических исследований пользуется большой популярностью. В мире существует несколько больших коллекций дрозофил, содержащих сотни тысяч линий (<http://flybase.org/>). В каждой лаборатории, использующей дрозофилу как модельный организм, также есть небольшие коллекции. Хранение коллекции дрозофил трудоемко и требует больших финансовых затрат. Кроме этого в процессе хранения есть риск потери или генетического загрязнения линии. Теряется также гетерозиготность исходной линии из-за близкородственных скрещиваний, обычно практикуемых при поддержании линий. Необходимость сохранения линий и желание сэкономить на содержании коллекций вызвали интерес к криоконсервации дрозофил. Первая попытка заморозить эмбрионы дрозофилы была предпринята в 1989 г. (Lynch *et al.*, 1989; Myers *et al.*, 1989). К этому времени были достигнуты значительные успехи в криоконсервации генеративных клеток и зародышей млекопитающих (в том числе человека) и клеточных линий растений (Mazur, 1970). В настоящее время >50% замороженного биологического материала сохраняет жизнеспособность после криоконсервации (Riggs *et al.*, 2008). Попытки криоконсервации насекомых оказались менее успешными (Mazur *et al.*, 1992a, b, 1993).

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭМБРИОНОВ ДРОЗОФИЛЫ

Основная причина гибели клеток при замораживании – образование кристаллов, повреждающих клеточные структуры. По этой причине клетки перед замораживанием выдерживают в растворах криопротекторов, защищающих структуру биополимеров, и проводят так называемую витрификацию, благодаря которой вместо кристаллов льда образуется стеклоподобная структура.

Яйцо дрозофилы покрыто хорионом, не проницаемым для криопротекторов и воды, что является одним из основных препятствий для криоконсервации этого объекта. Проницаемость хориона можно увеличить с помощью пермеабиллизации химическими растворителями, в частности 0.3%-ным раствором 1-бутанола в *n*-гептане в течение 1.5 мин (Mazur *et al.*, 1992b). Оказалось, что эмбрионы дрозофилы на разных стадиях развития обладают разной чувствительностью к таким обработкам (Myers *et al.*, 1989). После обработки смесью бутанола и гептана жизнеспособные личинки вылупляются из 80% эмбрионов, находящихся на 14-й стадии развития. Эмбрионы, находящиеся на более ранних или более поздних стадиях, такую обработку не выдерживают и погибают.

После пермеабиллизации хориона эмбрион выдерживают в криопротекторе и замораживают. В качестве криопротекторов используют сахара и их заменители, аминокислоты и их производные,

метиламины (Yancey *et al.*, 1982; Yancey, Siebenaler, 2015), позволяющие сохранять осмотическое давление в цитоплазме и ядре. При криоконсервации популярны также глицерин и диметилсульфоксид. В экспериментах на эмбрионах дрозофилы в качестве криопротектора использовали разные концентрации этиленгликоля или смесь этиленгликоля с поливинилпирролидоном (Mazur *et al.*, 1992a, b, 1993). На этом этапе крайне важен режим (скорость) заморозки. Яйцо дрозофилы в 3–4 раза крупнее, чем яйцеклетка человека, и содержит большое количество желтка, что, возможно, снижает скорость замораживания эмбрионов и отрицательно сказывается на результатах. К 14-й стадии развития большая часть желтка расходуется, возможно поэтому именно эта стадия развития оказывается менее чувствительной к замораживанию. Конец эмбрионального периода может быть более чувствительным к экстремальным воздействиям, в силу того что в это время начинается формироваться личиночная кутикула, которая отличается по составу от хориона яйца. После пермеабиллизации хориона смесью гептана и бутанола, обработки криопротекторами, заморозки в жидком азоте и последующего размораживания личинки вылупляются только из 20–30% эмбрионов. Большая часть личинок имеет дефекты развития, и только 3% выживших личинок превращаются во взрослых мух (Stenponkus *et al.*, 1990). Режим размораживания еще более важен, чем режим замораживания, и для каждого вида подбирается индивидуально (Mazur *et al.*, 1993). При медленном размораживании все эмбрионы погибают. Особенно критичны температуры –80...–40°C (Mazur *et al.*, 1993).

Возникает также сложность со сбором нужного количества эмбрионов, находящихся на нужной стадии развития. Дело в том, что 14-я эмбриональная стадия длится ~1 ч и надежно синхронизовать возраст эмбрионов по времени от момента откладки яиц не удается, так как в момент откладки яйца эмбрионы находятся на разных стадиях развития, поскольку в некоторых случаях их развитие начинается уже в половых путях самки. Также нужно иметь в виду, что изменение температуры содержания дрозофилы на 1°C меняет скорость развития на 15%. Поэтому нужно ориентироваться не столько на время, прошедшее от откладки яиц, сколько на морфологию эмбрионов (Mazur *et al.*, 1993). Следовательно, сбор больших количеств эмбрионов нужного возраста может быть дополнительным осложнением для криоконсервации больших коллекций.

Итак, из 5000 эмбрионов дрозофилы, находящихся на 14-й стадии развития, можно в лучшем случае получить 30 имаго, чтобы реанимировать линию после криоконсервации.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЛИЧИНОК И ИМАГО ДРОЗОФИЛЫ

Поскольку криоконсервация эмбрионов дрозофилы оказалась малоэффективной, были предприняты попытки заморозить дрозофил на других стадиях развития. Так, *Chymomyza costata* из семейства Drosophilidae выдерживает заморозку в жидком азоте и сохраняет жизнеспособность после разморозки на стадии личинки (выживает ~50% личинок) и имаго (выживает ~30% особей), но лишь при определенном режиме кормления, когда в корм вводится повышенное количество пролина (Košťál *et al.*, 2011).

К сожалению, успешный результат по криоконсервации *C. costata* не удалось повторить для *Drosophila melanogaster*, которая доминирует в большинстве коллекций (Košťál *et al.*, 2016). Объяснить это можно разной эффективностью метаболических путей, обеспечивающих защиту от внешних неблагоприятных условий среды у этих видов дрозофил. *C. costata* выживает в природе в северных районах (Lakovaaga *et al.*, 1972) на стадии поздней личинки, впадая в диапаузу, тогда как *D. melanogaster* является комменсалом и в природе встречается только в умеренных широтах. Разные виды дрозофил обладают разной способностью впадать в диапаузу, более того по этому параметру могут различаться особи одного вида, но из разных климатических зон (Zonato *et al.*, 2017).

Существует еще один способ экономии средств на содержание коллекций дрозофил – замедлить онтогенез и увеличить длительность жизни имаго.

СПОСОБЫ УДЛИНИТЬ ОНТОГЕНЕЗ

Удлинить онтогенез можно, снизив уровень метаболизма за счет пониженной температуры содержания, укорочения светового дня или снижения калорийности питания.

Известно, что включение в корм *D. melanogaster* живых дрожжей почти в 2 раза увеличивает массу имаго и в несколько раз увеличивает холодоустойчивость (Colinet, Renault, 2014). Увеличение массы сопровождается увеличением доли белка в теле мух на единицу сухой массы. Концентрация липидов при этом остается постоянной. Добавка разных аминокислот в корм личинкам показала, что наибольший вклад в холодоустойчивость мух вносят пролин, аргинин и глутатион (Colinet, Renault, 2014; Košťál *et al.*, 2016; MacMillan *et al.*, 2016).

Дрозофила плохо переносит температуры, близкие к нулю. Даже после гиперпролинизации мухи не выдерживают температуры ниже –7.5°C. При 5°C мухи, питавшиеся кормом с пролином, могут прожить максимум 20 сут, увеличение температуры содержания всего на 1°C (до 6°C) продлевает жизнь мух и личинок в 3 раза. Заметнее

всего увеличивается устойчивость дрозофилы к пониженным температурам, если использовать не константный, а флуктуирующий температурный режим содержания. Если большую часть суток мухи живут при 6°C, но на несколько часов в течение дня температура повышается до 11°C, то длительность жизни увеличивается в 2–3 раза по сравнению с таковой в случае содержания при константной температуре 6°C.

Содержание метаболитов в теле дрозофилы также флуктуирует в соответствии с температурой содержания. При константной температуре кривая концентрации метаболитов плавная, при флуктуирующей температуре – зигзагообразная и подсаживает при 11°C, опускаясь до константной кривой при 6°C. Данные RNA-seq и данные, полученные с помощью количественной ПЦР, по экспрессии разных РНК практически равноценны. Разные методические подходы дали одинаковый результат: при флуктуирующей температуре содержания дрозофил профили экспрессии РНК при 6°C очень похожи на профили при 11°C, но сильно отличаются от профилей при константной температуре 6°C. Видимо, запаса РНК, синтезирующегося при 11°C, хватает, чтобы пережить пониженную температуру. При этом экспрессия генов, поддерживающих гомеостаз клеток, при пониженной температуре увеличилась, но большая часть генов свою активность снизила (Košťál *et al.*, 2016).

Дрозофила перестает размножаться при 12°C. При этой температуре можно вызвать искусственную диапаузу. Интересно, что искусственная диапауза спонтанно прерывается через 6–8 нед, если дрозофил содержат при постоянной пониженной температуре с коротким световым периодом (Zonato *et al.*, 2017). Снижение температуры содержания сказывается на диапаузе дрозофил в большей степени, чем длительность светового дня (Lakovaara *et al.*, 1972). На *Drosophila suzukii* тестировали разные температурные режимы содержания личинок с разной продолжительностью светового дня (Jakobs *et al.*, 2017). От времени откладки яиц до вылета имаго проходило 15 сут при 21.5°C и 13-часовой длине светового дня. При флуктуирующем температурном режиме (5.5°C/19°C) и длительности освещения 11.5 ч вылет имаго наблюдался через 40 сут. При постоянной температуре содержания (11°C) и 10-часовом световом дне вылет имаго задерживался почти на 2 мес. (Jakobs *et al.*, 2017).

Продолжительность жизни имаго увеличивает также ограничение калорийности пищи (Piper, Partridge, 2007). К сожалению, надежного универсального метода, который позволил бы гарантированно удлинить жизнь дрозофилы, нет. Для каждой линии и каждой мутации калорийность корма и режим содержания необходимо подби-

рать индивидуально. Обычно мутантные линии содержат на высококалорийном корме, а линии с диким фенотипом – на низкокалорийном.

Работа выполнена за счет бюджетного проекта № 0324 2019 0041.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Colinet H., Renault D. Dietary live yeast alters metabolic profiles, protein biosynthesis and thermal stress tolerance of *Drosophila melanogaster* Part A // *Comp. Biochem. Phys.* 2014. V. 170. P. 6–14.
- Jakobs R., Ahmadi B., Houben S., Garipey T.D., Sinclair B.J. Cold tolerance of third-instar *Drosophila suzukii* larvae // *J. Insect. Physiol.* 2017. V. 96. P. 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.10.008>
- Košťál V., Zahradnicková H., Šimek P. Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata* survive cryopreservation in liquid nitrogen // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 13041–13046. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107060108>
- Košťál V., Korbelová J., Poupardin R., Moos M., Šimek P. Arginine and proline applied as food additives stimulate high freeze tolerance in larvae of *Drosophila melanogaster* // *J. Exp. Biol.* 2016. V. 219 (Pt 15). P. 2358–2367. <https://doi.org/10.1242/jeb.142158>
- Lakovaara S., Saura A., Koref-Santibañez S., Ehrman L. Aspects of diapause and its genetics in northern drosophilids // *Hereditas.* 1972. V. 70. P. 89–96.
- Lynch D.V., Lin T.T., Myers S.P., Leibo S.P., Macintyre R.J., Pitt R.E., Steponkus P.L. A two-step method for permeabilization of *Drosophila* eggs // *Cryobiology.* 1989. V. 26. P. 445–452.
- MacMillan H.A., Knee J.M., Dennis A.B., Udaka H., Marshall K.E., Merritt T.J., Sinclair B.J. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 28999. <https://doi.org/10.1038/srep28999>
- Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems // *Science.* 1970. V. 168. P. 939–949. <https://doi.org/10.1126/science.168.3934.939>
- Mazur P., Cole K.W., Mahowald A.P. Critical factors affecting the permeabilization of *Drosophila* embryos by alkanes // *Cryobiology.* 1992a. V. 29. P. 210–239.
- Mazur P., Cole K.W., Schreuders P.D., Mahowald A.P. Contributions of cooling and warming rate and developmental stage to the survival of *Drosophila* embryos cooled to –205 degrees C // *Cryobiology.* 1993. V. 30. P. 45–73. <https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1006>
- Mazur P., Cole K.W., Hall J.W., Schreuders P.D., Mahowald A.P. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos // *Science.* 1992b. V. 258. P. 1932–1935.
- Myers S.P., Pitt R.E., Lynch D.V., Steponkus P.L. Characterization of intracellular ice formation in *Drosophila melanogaster* embryos // *Cryobiology.* 1989. V. 26. P. 472–484.
- Piper M.D.W., Partridge L. Dietary restriction in *Drosophila*: delayed aging or experimental artefact? // *PLoS Genetics.* 2007. V. 3. Iss. 4. e57 0461.
- Riggs R., Mayer J., Dowling-Lacey D., Chi T.F., Jones E., Oehninger S. Does storage time influence postthaw sur-

- vival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos // *Fertil. Steril.* 2008. V. 93. P. 109–115.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.084>
- Steponkus P.L., Myers S.P., Lynch D.V., Gardner L., Bronshteyn V., Leibo S.P., Rall W.F., Pitt R.E., Lin T.T., MacIntyre R.J.* Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos // *Nature.* 1990. V. 345. P. 170–172.
- Yancey P.H., Siebenaller J.F.* Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective micromolecules and their roles in marine organisms // *J. Exp. Biol.* 2015. V. 218 (Pt 12). P. 1880–1896.
<https://doi.org/10.1242/jeb.114355>
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S., Bowlus R.D., Somero G.N.* Living with water stress: evolution of osmolyte systems // *Science.* 1982. V. 217. P. 1214–1222.
- Zonato V., Collins L., Pegoraro M., Tauber E., Kyriacou C.P.* Is diapause an ancient adaptation in *Drosophila*? // *J. Insect. Physiol.* 2017. V. 98. P. 267–274.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.017>

Cryopreservation of *Drosophila* or How to Save Labor on the Collection Maintaining

L. P. Zakharenko^{1,2,#}

¹*Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentieva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

[#]*e-mail: zakharp@bionet.nsc.ru*

Here the literature analysis of the *Drosophila melanogaster* cryopreservation has been done. Cryopreservation of *D. melanogaster* embryos is possible only at the 14th stage of development after permeabilization of the chorion that prevents the penetration of cryoprotectants, and has 3% success. Successful cryopreservation of larvae and adults of *Drosophila* has been carried out so far only for the *Chymomyza costata*. Ontogenesis of *D. melanogaster* can be prolonged by caloric restriction, reducing the temperature and shortening the light period to save on the maintaining of collection.