

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФОРМЫ И РАЗМЕРОВ КРЫЛА В СЕЛЕКТИРОВАННЫХ ПО ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЛИНИЯХ *MUSCA DOMESTICA* L.: ГЕОМЕТРИЧЕСКАЯ МОРФОМЕТРИЯ

© Т.Т. Ахметкиреева¹, Г.В. Беньковская¹, А.Г. Васильев²

¹ ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН», Уфа;

² ФГБУН «Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН», Екатеринбург

Для цитирования: Ахметкиреева Т.Т., Беньковская Г.В., Васильев А.Г. Изменчивость формы и размеров крыла в селектированных по продолжительности жизни линиях *Musca domestica* L.: геометрическая морфометрия // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16. – № 1. – С. 35–44. doi: 10.17816/ecogen16135-44.

Поступила в редакцию: 20.01.2018

Принята к печати: 14.03.2018

☼ **Цель:** оценка морфогенетических последствий массовой селекции по длительности жизни и степени дифференциации линий комнатной мухи. **Методы:** анализ изменчивости размеров и формы крыла имаго методами геометрической морфометрии. **Результаты.** Между линиями *Sh gen* (короткоживущие) и *L gen* (долгоживущие) выявлены значимые устойчивые различия по размерам и форме крыла и значимое уменьшение размера крыла в линии *L gen*. Внутригрупповое разнообразие (*MNND*) формы крыла имаго линии *Sh gen* значимо выше, чем у линии *L gen*. Эффект сверхрассеивания ординат отражает дестабилизацию развития. **Выводы:** выявленные морфогенетические перестройки могут быть сформированы на основе исторически сложившегося веера потенциальных онтогенетических траекторий вида, характерных для популяции с подразделенной структурой.

☼ **Ключевые слова:** *Musca domestica*; изменчивость; селектированные линии; сроки репродукции; половые различия; геометрическая морфометрия.

VARIABILITY IN SIZE AND SHAPE OF WINGS IN LONGEVITY-SELECTED STRAINS OF HOUSE FLY (*MUSCA DOMESTICA* L.): GEOMETRIC MORPHOMETRICS

© Т.Т. Akhmetkireeva¹, G.V. Ben'kovskaya¹, A.G. Vasil'ev²

¹ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia;

² Institute of Plant and Animal Ecology UB RAS, Yekaterinburg, Russia

For citation: Akhmetkireeva TT, Ben'kovskaya GV, Vasil'ev AG. Variability in size and shape of wings in longevity-selected strains of house fly (*Musca domestica* L.): geometric morphometrics. *Ecological genetics*. 2018;16(1):35-44. doi: 10.17816/ecogen16135-44.

Received: 20.01.2018

Accepted: 14.03.2018

☼ **Background.** The aim of the study is evaluate the long-term morphogenetic consequences of the housefly mass selection by the lifespan of two formed strains with different longevity. **Materials and methods.** Two control groups were detached from the strains *Sh gen* (short-living adults) after 65th and *L gen* (long-living) after 45th generations of selection for early or late reproduction. Geometric morphometrics of the fly's wing shape are made from the configurations of 17 homologous Landmarks positioned on the wings images. The direction and magnitude of the interstrain differences were estimated using the canonical analysis of Procrustes coordinates, which characterized the variability of the wing shape. The degree of intra-group morphological disparity from the values of the first two canonical variables was analyzed by the nearest neighbour point pattern analysis. **Results.** Significant interstrain and sex differences in the shape and size of the wing were revealed. The size of the wing plate of males and females of the *Sh gen* strain and the level of intragroup disparity are significantly larger than in the *L gen* strain. The pattern of intragroup disparity of the wing shape of the *Sh gen* adults is characterized by a significant effect of ordinales overdispersion. **Conclusion.** A hypothesis has been put forward that the revealed morphogenetic rearrangements in individuals of both strain formed on the base of historically existing potent ontogenetic trajectories of species. It is assumed that the basis for morphogenesis rearrangements are the primary epigenetic changes due to the transposition of the mobile elements of the genome.

☼ **Keywords:** *Musca domestica*; variability; selected strains; reproductive terms; geometric morphometrics.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема выявления генетических и эпигенетических механизмов быстрых морфологических пере-

строек, возникающих после направленной селекции, а также дальнейшего их устойчивого сохранения, пока далека от своего решения [1–6]. Особое значение

при этом имеет поиск экологических и генетических факторов возможных быстрых перестроек морфогенеза. Перестройки могут быть преадаптивными, то есть исторически обусловленными уже сложившимся веером потенциальных онтогенетических траекторий. Это предполагает возможность их быстро вновь реактивировать и «мобилизовать», то есть подхватить и зафиксировать отбором.

В качестве адекватной генетической модели таких быстрых изменений, связанных с селективным расколом исходной генетически единой линии, можно рассматривать результат направленного дизруптивного отбора в линии *S* комнатной мухи (*Musca domestica*) на изменение продолжительности жизни и сроков репродукции [7]. За относительно короткое время (14–16 поколений) массовый отбор привел к становлению двух новых линий — *Sh gen* (короткоживущие) и *L gen* (долгоживущие). Лабораторные линии после прекращения отбора устойчиво сохранили новые свойства в течение 4–5 последующих поколений [7–9]. Получив стабильно размножающиеся гетерогенные линии с разной продолжительностью жизни, мы установили, что сроки развития на стадии личинки и пупария у них не различаются; нет и достоверных различий в плодовитости имаго. Это дало нам возможность исследовать линии, считая, что основные генетические различия затрагивают такие сложные признаки, как интенсивность и частота репродуктивных циклов и связанная с интенсивностью размножения продолжительность жизни. Ранее мы обнаружили, что при селекции в линиях комнатной мухи на устойчивость к любому неблагоприятному фактору, а также при отборе по продолжительности жизни наблюдается закономерное снижение уровня внутривидового полиморфизма на протяжении первых 10 поколений отбора [9], нас интересовало, как эти внутривидовые процессы будут проявляться в изменчивости морфологических показателей размеров и формы крыла.

В последние годы при анализе фенотипической изменчивости все шире применяются методы геометрической морфометрии [10–14], позволяющие отдельно изучать изменчивость размеров и формы объектов и визуализировать изменения формы (shape) изучаемых морфологических объектов. Особое значение имеет то обстоятельство, что данный подход допускает возможность морфогенетической интерпретации выявляемых различий формы [12, 15]. Модельные линии *Sh gen* и *L gen* комнатной мухи позволяют с помощью методов геометрической морфометрии оценить степень и устойчивость межлинейной морфологической дифференциации потомков мух после прекращения массового отбора.

Цель исследования поэтому состояла в оценке отдаленных морфогенетических последствий массовой селекции по продолжительности жизни и степени

межлинейной дифференциации комнатной мухи на основе анализа изменчивости размеров и формы крыла имаго обоих полов с помощью методов геометрической морфометрии. Особый интерес заключался в сравнении у самцов и самок линий *Sh gen* и *L gen* уровней внутригруппового фенотипического разнообразия (disparity), косвенно характеризующих стабильность морфогенеза [16].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Имаго лабораторной исходной линии *S*, произошедшей от линии *Cooper*, были любезно переданы нам проф. С.А. Рославцевой (НИИ дезинфектологии, Москва). Мух содержали в капроновых садках размером 30 × 30 × 30 см с металлическим каркасом, в качестве корма использовали сухое молоко. Личинки развивались в пластиковых контейнерах с увлажненными отрубями в стандартных условиях [7] при комнатной температуре (+23...+26 °С) и освещении с фотопериодом 12 ч.

Из исходной линии *S* методом отбора на раннее и позднее репродуктивное усилие были выделены массовые гетерогенные линии *Sh gen* и *L gen*, достоверно различающиеся по показателю средней минимальной продолжительности жизни имаго, составившему соответственно 22 и 54 сут. Для создания линии *Sh gen* из исходной линии *S* на протяжении трех поколений отбирали яйца, отложенные в течение первых двух недель со дня вылета имаго. Для создания линии *L gen* отбирали яйца, отложенные не ранее чем через 25–28 сут со дня вылета имаго. Линии достоверно различаются по продолжительности жизни: в 30-м поколении максимальная продолжительность жизни в линии *Sh gen* не превышала 42 сут, тогда как для линии *L gen* максимальная продолжительность жизни имаго составляла 67 сут [7]. На основе этих линий соответственно 65 и 45 поколений отбора на раннюю или позднюю репродукцию были выделены контрольные группы *Sh gen* и *L gen*, к которым отбор по срокам репродукции в дальнейшем в течение 4–5 поколений не применяли. Начальная численность каждой группы составляла 50 самок и 50 самцов, отобранных сразу после выхода из пупариев.

Фиксация материала

Для анализа брали крылья имаго, отобранных для выделения ДНК и фиксированных в растворе (3 части спирта: 3 части пропиленгликоля: 1 часть дистиллированной воды) либо естественно погибших по окончании жизни. Правое и левое крыло отделяли пинцетом в месте соединения с тораксом и помещали на предметное стекло, смоченное фиксирующим раствором. Покрывали покровным стеклом и фотографировали под микроскопом МБС-10 при помощи USB каме-

ры UCMOS03100KPA и программного обеспечения ToupView при разрешении 2048×1536 пикс.

Методы геометрической морфометрии и статистического анализа

Геометрическая морфометрия формы крыла линейных мух выполнена по конфигурации 17 гомологичных меток-ландмарков (landmarks), размещенных на изображениях крыльев (рис. 1) с помощью программ tpsUtil и tpsDig2 (экранный дигитайзер) Ф.Дж. Рольфа [17, 18].

Объем изученного материала линии *Sh gen* составил 70 (самцы — 34, самки — 36), а *L gen* — 118 (самцы — 60, самки — 58) оцифрованных крыльев.

Для косвенной характеристики изменчивости размеров объектов использовали размер центроида (*CS* — centroid size) — квадратный корень из суммы квадратов расстояний от центра крыла до каждой из меток-ландмарков [10].

Процедуру суперимпозиции конфигураций ландмарков выполнили методом генерализованного прокрустового анализа [10], основанного на использовании метода наименьших квадратов (GPA — generalized Procrustes analysis), и вычислили прокрустовы координаты (Procrustes coordinates), характеризующие изменчивость формы (shape) крыла. Межгрупповые различия конфигураций крыла оценивали с помощью канонического анализа прокрустовых координат. По матрице обобщенных расстояний Махаланобиса (D^2) с помощью кластерного анализа (UPGMA) определили иерархию межгрупповых различий, используя программу PAST [19], включающую процедуру бутстреп-анализа.

Для выявления возможной аллометрической зависимости [20], то есть зависимости изменения формы крыла от его размеров, оценили регрессию значений первой главной компоненты формы — *PC1* от величин натуральных логарифмов размера центроида — $\ln CS$.

С целью интерпретации факторов межгрупповой изменчивости вдоль канонических переменных провели многомерный непараметрический двухфакторный дисперсионный анализ PERMANOVA [21] при помощи перестановочного теста (Permutation test) с 10000 репликами.

Степень внутригруппового морфологического разнообразия (disparity) оценили методом определения паттерна ближайших соседних точек (nearest neighbour point pattern analysis) в пределах полигона изменчивости (convex hull) ординат, предложенным Дж.С. Дэвисом [22] и реализованным К. Хаммером в программе PAST [23]. Расчеты провели по значениям первых двух канонических переменных (*CV1* и *CV2*). В соответствии с методом оценили показатель *R* — отношение значения наблюдаемой средней дистанции между ближайшими соседними ординатами (*MNND* — mean nearest neighbor distance) к величине ожидаемой средней дистанции (μ), полученной для полигона изменчивости на основе распределения Пуассона. Для проверки нулевой гипотезы о том, что наблюдаемое *MNND* равно значению μ для случайного рассеивания точек при той же плотности ординат в пределах полигона изменчивости, применили *Z*-критерий ближайшего соседа [22]. Для уменьшения краевого эффекта рассеивания ординат использовали метод К.П. Доннелли [24]. Показатель *R* характеризует модель рассеивания ординат: при условии $R < 1$ проявляется кластеризация ординат, при $R = 1$ — случайное пуассоновское рассеивание, а если $R > 1$, то проявляется эффект сверхрассеивания (overdispersion). Последний случай можно интерпретировать при значимом отклонении *R* от 1 как возрастание внутригруппового морфоразнообразия [23], а при использовании методов геометрической морфометрии — расширение веера траекторий морфогенеза [16].

Оценка соответствия варьирования выборочных размеров центроида (*CS*) нормальному закону распределения проведена на основе *W*-теста Шапиро — Уилка [25]. Однородность выборочных дисперсий оценивали на основе теста Левене (Levene's test), а статистическую значимость различий при множественном сравнении выборок — с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Парное сравнение провели на основе апостериорного *Q*-теста Тьюки (post-hoc Tukey's *Q*-test). Размер эффекта (effect size) по итогам парных и множественных межгрупповых сравнений оценили на основе критериев *d* и f^2 Коэна [26, 27]. Расчеты выполнены с помощью пакетов прикладных программ TPS [17, 18], PAST 2.17c [19], MorphoJ 1.06d [13].

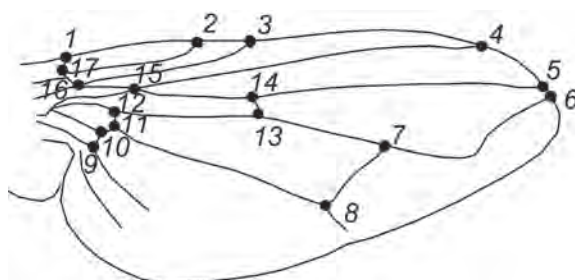


Рис. 1. Схема расстановки меток-ландмарков (1–17) на крыле комнатной мухи
Fig. 1. Locations of landmarks (1–17) on wing of house fly

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнили размеры центроида (*CS*) крыла у самцов и самок обеих линий. Показано, что распределение *CS* во всех выборках согласно *W*-тесту Шапиро–Уилка (Shapiro-Wilk *W* test) соответствует нормальному закону (от $p = 0,053$ до $p = 0,706$). На основе теста Левене (Levene's test) была установлена однородность выборочных дисперсий размера центроида крыловой пластинки ($p = 0,817$), что позволило применить при множественном сравнении выборок однофакторный дисперсионный анализ. В целом однофакторный дисперсионный анализ выявил значимые межгрупповые различия по этому показателю между группами самцов и самок линий *Sh gen* и *L gen* (табл. 1).

Размер эффекта (effect size) по f^2 Коэна составил в данном случае 0,423, что превышает принятый для больших различий уровень $f^2 = 0,35$ [26, 27]. Статистическую значимость различий по размерам центроида между выборками оценили с помощью парного апостериорного *Q*-теста Тьюки. Сравнение выявило, что размер центроида крыльев у самцов и самок мух линии *L gen* значимо меньше, чем у соответствующих групп линии *Sh gen* (табл. 2, 3). Значимые различия между самцами и самками внутри линий по величине *CS* обнаружены не были (см. табл. 3).

В результате канонического анализа прокрустовых координат, характеризующих изменчивость формы крыла самцов и самок линий *Sh gen* и *L gen*, установлено,

Таблица 1

Результаты однофакторного дисперсионного анализа размеров центроида (*CS*) крыла самцов и самок линий *Sh gen* и *L gen* комнатной мухи

Table 1

Results of one-way ANOVA for variation in the size of centroid (*CS*) for the wing of males and females of the *Sh gen* and *L gen* strains of house fly

Источник изменчивости	Сумма квадратов (SS)	<i>d.f.</i>	Средний квадрат (MS)	<i>F</i>	Уровень значимости
Межгрупповая	1133740,0	3	377912,0	27,51	$p = 1,981 \cdot 10^{-15}$
Внутригрупповая	2527550,0	184	13736,7		
Общая	3661280,0	187			

Таблица 2

Размеры центроида (*CS*) крыла с учетом стандартных ошибок (*SE*) у самцов и самок линий *Sh gen* и *L gen* комнатной мухи

Table 2

Wing centroid sizes (*CS*) with standard errors (*SE*) in the males and females of *Sh gen* and *L gen* strains of house fly

Показатель	Линии комнатной мухи			
	<i>Sh gen</i>		<i>L gen</i>	
Пол	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Объем выборки, <i>n</i>	34	36	60	58
<i>CS</i> ± <i>SE</i>	1810,02 ± 18,85	1867,88 ± 18,33	1678,86 ± 15,56	1688,37 ± 16,01

Таблица 3

Результаты парного сравнения на основе апостериорного *Q*-теста Тьюки (Tukey's *Q*-test): выше диагонали матрицы — уровни значимости различий (p), ниже диагонали — значения *Q*

Table 3

Results of pair comparison based on post-hoc Tukey's *Q*-test: above the diagonal, p -values; below the diagonal, *Q*-values

Выборка	Линии комнатной мухи			
	<i>Sh gen</i>		<i>L gen</i>	
Пол	Самцы	Самки	Самцы	Самки
<i>Sh gen</i> , самцы	—	$p = 0,0951$	$p < 0,00001$	$p = 0,00001$
<i>Sh gen</i> , самки	3,27	—	$p < 0,00001$	$p < 0,00001$
<i>L gen</i> , самцы	7,42	10,69	—	$p = 0,9813$
<i>L gen</i> , самки	6,88	10,15	0,54	—

что вдоль первой канонической переменной, на которую приходится 67,37 % межгрупповой дисперсии, в основном проявились межлинейные различия (рис. 2). Вдоль второй канонической оси (29,87 % дисперсии) отчетливо выражены половые различия по форме крыла. На рисунке видно, что у обеих линий верхние эллипсоиды рассеивания ординат принадлежат самкам, а нижние — самцам. Вдоль третьей канонической переменной (2,76 % дисперсии) проявилось взаимодействие факторов «линия» × «пол».

Межгрупповые различия вдоль всех канонических переменных статистически значимы ($p < 0,001$). Для визуализации направлений межгрупповых различий формы на рисунке представлены контурные изображения крыла — аутлайны (outlines), характеризующие наибольшие и наименьшие изменения (деформации) их строения вдоль канонических переменных относительно усредненного консенсусного состояния (см. рис. 2).

Видно, что у представителей линии *L gen* дистальный край крыла выгнут и отчасти заострен, тогда как у мух линии *Sh gen* передний край крыла ровный, горизонтально выпрямлен, а дистальный укорочен и несколько смещен к заднему краю. Различия затрагивают также форму, расположение жилок и относительную величину ячеек крыла.

У самцов и самок обеих линий проявляются характерные половые различия в форме и структуре крыла, что хорошо заметно при сравнении с усредненной консенсусной (consensus) формой. Если у самок крыловая пластинка имеет округлую эллипсовидную форму, то у самцов она вытянута и слегка заострена в дистальном направлении.

Оценка корректности классификации крыльев с помощью канонического анализа показала, что распозна-

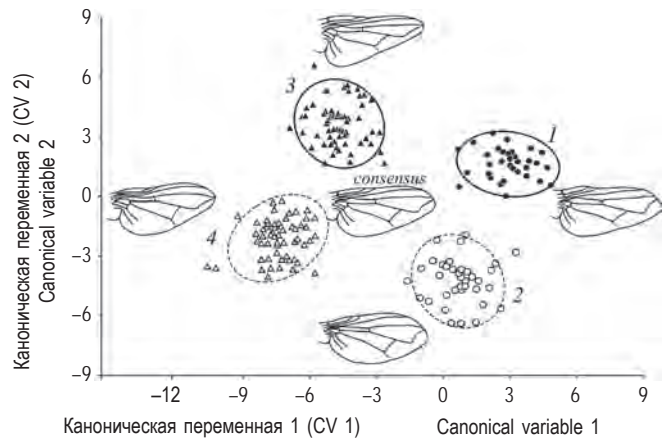


Рис. 2. Результаты канонического анализа прокрустовых координат, характеризующих изменчивость формы крыла, самцов (1, 3) и самок (2, 4) линий *Sh gen* (1, 2) и *L gen* (3, 4) комнатной мухи. Контурные изображения деформаций крыла — аутлайны (outlines) соответствуют минимальным и максимальным значениям вдоль канонических переменных. Эллипсоиды включают 95 % дисперсии выборок

Fig. 2. Results of canonical analysis of Procrustes coordinates characterizing shape variation of the wing in males (1, 3) and females (2, 4) of *Sh gen* (1, 2) and *L gen* (3, 4) strains of house fly. Contour images of wing deformations — outlines correspond to the maximum and minimum values on the canonical axes. Ellipsoids include 95% of sample dispersion

вание принадлежности ординат особей к собственной группе близко к абсолютному, варьируя в пределах от 96,7 до 100 % (табл. 4).

Таблица 4

Оценка корректности классификации объектов по итогам канонического анализа формы крыла при сравнении самцов и самок линий *Sh gen* и *L gen* комнатной мухи

Table 4

Assessment of the correctness in object classification by means of canonical analysis for the shape of the wing in comparisons of males and females of *Sh gen* and *L gen* strains of house fly

Линия, пол	<i>Sh gen</i>		<i>L gen</i>		Объемы выборок
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	
Результаты классификации объектов при каноническом анализе					
<i>Sh gen</i> , самцы	34	0	0	0	35
<i>Sh gen</i> , самки	0	36	0	0	69
<i>L gen</i> , самцы	0	0	59	1	60
<i>L gen</i> , самки	0	0	1	57	58
Итоги анализа:	34	36	60	58	188
Корректность, %	100	100	98,3	100	98,9
Результаты перекрестного тестирования методом «складного ножа» (jackknife)					
<i>Sh gen</i>, самцы	34	0	0	0	34
<i>Sh gen</i> , самки	0	36	0	0	36
<i>L gen</i> , самцы	0	0	59	1	60
<i>L gen</i> , самки	0	0	2	56	58
Итоги анализа:	34	36	61	57	188
Корректность, %	100	100	96,7	98,2	98,4

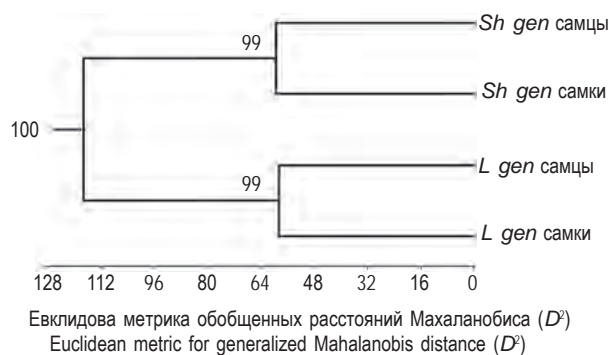


Рис. 3. Результаты кластерного анализа (UPGMA) матрицы обобщенных расстояний Махаланобиса (D^2) между группами самцов и самок линий *Sh gen* и *L gen* комнатной мухи

Fig. 3. Results of UPGMA cluster analysis of a generalized Mahalanobis distance (D^2) matrix between males and females samples of *Sh gen* and *L gen* strains of house fly

Средний уровень корректности дискриминации объектов составляет 98,9 % и сохраняется практически на том же уровне (98,4 %) после процедуры перекрестного тестирования результатов классификации методом «складного ножа» (jackknife) [11, 12]. Стабильность распознавания формы крыла отражает морфогенетическую устойчивость и внутреннюю генетическую однородность сравниваемых групп мух. Поскольку давление фактора прямого отбора отсутствует в течение 4–5 последних поколений, данное явление прямо указывает на фиксацию специфичных для каждой линии и пола морфогенетических ограничений при формировании крыла.

Для более строгой интерпретации канонических переменных и оценки значимости межгрупповых различий, обусловленных факторами «линия» (*ST*), «пол» (*SX*) и их взаимодействием (*ST* × *SX*), по всем трем каноническим переменным провели многомерный непараметрический двухфакторный дисперсионный анализ PERMANOVA [21], использующий перестановоч-

ный тест (Permutation test) с 10000 ресэмплинговыми репликами (табл. 5). В итоге проведенного расчета подтверждены значимость межлинейных и половых различий, а также взаимодействия факторов («линия» × «пол»). Несмотря на относительно небольшую величину межгрупповой дисперсии, приходящуюся на взаимодействие факторов, определенная специфика формы крыла самцов и самок у разных линий проявляется устойчиво.

Кластерный анализ (UPGMA) матрицы обобщенных расстояний Махаланобиса (D^2) между центроидами сравниваемых выборок подтвердил, что межлинейные различия существенно превышают уровень половых различий (рис. 3).

Примечательно, что среднее обобщенное расстояние Махаланобиса между линиями ($D^2 = 64,45$) почти в 3 раза больше, чем средняя дистанция между выборками разного пола ($D^2 = 22,87$).

Выявленные межлинейные различия по размерам крыла для линий с разной продолжительностью жизни в той или иной степени должны быть связаны с изменениями его формы, то есть обусловлены аллометрическими эффектами [20]. Для проверки этого предположения оценили регрессионную зависимость значений первой относительной деформации (*RW1*), которая при масштабирующем коэффициенте $\alpha = 0$ является аналогом первой главной компоненты формы (*PC1*), от величины натурального логарифма размера центроида (*lnCS*), косвенно характеризующего размеры крыла. При этом установлено, что доля дисперсии объясненной регрессии для *RW1* от общей дисперсии составила в линии *Sh gen* у самцов 0,6 % ($p = 0,6557$), у самок — 5,1 % ($p = 0,0392$), а в линии *L gen* соответственно 21,3 % ($p = 0,0001$) и 2,7 % ($p = 0,2147$). Следовательно, только у самцов линии *L gen* проявился аллометрический эффект, а в остальных группах он либо строго не доказан (самки линии *Sh gen*), либо статистически

Таблица 5

Результаты многомерного непараметрического двухфакторного дисперсионного анализа PERMANOVA канонических переменных, характеризующих межгрупповую изменчивость формы крыла самцов и самок линий *Sh gen* и *L gen* комнатной мухи

Table 5

Results of multivariate non-parametric two-way analysis of variance PERMANOVA in the canonical variables characterizing intergroup shape variation of the wing in males and females of *Sh gen* and *L gen* strains of house fly

Источник изменчивости (фактор)	Сумма квадратов	<i>d.f.</i>	Средний квадрат	<i>F</i>	Уровень значимости (<i>p</i>)
Линия (<i>ST</i>)	2374,40	1	2374,40	752,54	0,0001
Пол (<i>SX</i>)	1130,40	1	1130,40	358,27	0,0001
Взаимодействие (<i>ST</i> × <i>SX</i>)	91,60	1	91,60	29,03	0,0001
Остаточная (<i>Residual</i>)	580,56	184	3,16		
Общая (<i>Total</i>)	4176,96	187			

Таблица 6

Сравнение показателей, характеризующих паттерны внутригруппового разнообразия формы крыла в выборках самцов и самок линий *Sh gen* и *L gen* комнатной мухи по значениям первых двух канонических переменных

Table 6

Comparison of the indices characterizing within-group shape disparity of wing in the samples of males and females of *Sh gen* и *L gen* strains of house fly based on values of the first two canonical variables

Показатели	Линия комнатной мухи (пол)			
	<i>Sh gen</i> (самцы)	<i>Sh gen</i> (самки)	<i>L gen</i> (самцы)	<i>L gen</i> (самки)
Число особей, <i>n</i>	34	36	60	58
Наблюдаемая <i>MNND</i>	0,418 ± 0,053	0,432 ± 0,054	0,280 ± 0,029	0,282 ± 0,028
Ожидаемое значение (μ)	0,332 ± 0,027	0,338 ± 0,027	0,261 ± 0,016	0,256 ± 0,016
<i>R</i> -отношение	1,26	1,28	1,07	1,10
<i>Z</i> -критерий	2,59	2,89	0,97	1,36
Вероятность случайного распределения ординат, <i>p</i>	0,0096	0,0039	0,3320	0,1750

незначим. В целом для совокупности особей обеих линий проявляется слабая, но статистически значимая регрессионная зависимость изменчивости формы ($RWI = PCI$) от размеров ($\ln CS$), поскольку доля объясненной дисперсии в этом случае составляет 6,8 % ($p < 0,0001$).

На основе значений первых двух канонических осей (*CV1* и *CV2*) для всех выборок выполнили расчет показателей *MNND*, характеризующих уровни внутригруппового морфологического разнообразия (disparity), а также вычислили ожидаемую меру разнообразия (μ), отношение *R* и оценили значимость (*p*) его отклонения от 1,0 на основе *Z*-критерия [22]. При сравнении значений показателя *MNND* выявлен значимо больший уровень внутригруппового морфоразнообразия у самцов и самок линии *Sh gen* по сравнению с представителями линии *L gen* (табл. 6).

При межлинейном сравнении *MNND* размер эффекта (effect size) по показателю *d* Коэна между самцами составил 0,538, а между самками — 0,580, то есть несколько превысил принятый для *d* средний уровень (0,50). В свою очередь, размер эффекта при сравнении *MNND* самцов и самок в линии *Sh gen* составил 0,044 (ниже принятого минимального уровня 0,20), а в линии *L gen* — 0,308 (между минимальным и средним уровнями *d*). Результаты сравнения также показали, что у самцов и самок линии *Sh gen* наблюдается значимый эффект сверхрассеивания (overdispersion) ординат ($R > 1$) в пределах вычисляемого полигона изменчивости (см. табл. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку логарифм размера центроида ($\ln CS$) пропорционален размерам крыльев мух, можно заключить, что у линии *L gen* наблюдается ингибирование роста крыла имаго в отличие от *Sh gen*. Другими словами, крылья долгоживущих и поздно созревающих мух *L gen*

не достигают размеров крыла рано созревающих и короткоживущих представителей линии *Sh gen*. Однако предположения о том, что разные размеры крыла у линий могут приводить к аллометрическим эффектам [20] при анализе регрессионной зависимости размеров и формы крыла оказались верными только у самцов *L gen*. Таким образом, аллометрические эффекты в изменчивости формы крыла, обусловленные разной соотносительной скоростью роста его отдельных частей, во всех группах, кроме, возможно, группы самцов линии *L gen*, не являются сопутствующим фактором морфогенетической дифференциации.

Обращает на себя внимание высокий уровень дискриминации особей сравниваемых выборок по форме крыльев, обычно характерный для межвидовых сравнений [28] и обеспечивающий практически безошибочное определение и разделение не только представителей разных линий, но и самцов и самок в пределах линий и между ними. Морфогенетические различия, связанные с линейной спецификой мух, почти в два раза больше по уровню, чем морфологические особенности имаго самцов и самок. Последнее указывает на существенную морфогенетическую перестройку крыльев имаго у линий комнатной мухи в результате проведенного ранее массового отбора на разную продолжительность жизни. Устойчивое наследование фенотипических черт крыловой пластинки каждой сравниваемой группой имаго в течение нескольких лабораторных поколений косвенно указывает на генетическую и, возможно, и эпигенетическую фиксацию морфогенетических перестроек.

Таким образом, на основе методов геометрической морфометрии обнаружена межлинейная специфика изменчивости формы и направлений морфогенеза крыла у мух линий *Sh gen* и *L gen*, а также параллелизм в проявлении полового диморфизма конфигурации крыловой пластинки имаго. Повышенное внутригрупповое морфораз-

нообразии крыла и эффект сверхрассеивания ординат в пределах полигонов изменчивости имаго *Sh gen* косвенно указывают на нестабильность морфогенеза крыловой пластинки. Одновременно это свидетельствует об их более высокой морфогенетической пластичности и лабильности [29], чем у мух линии *L gen*.

Высокая эффективность отбора и быстрая фиксация морфогенетических изменений, устойчиво сохраняющихся в течение нескольких поколений (4–5) после его завершения, позволяют с известной осторожностью заключить, что у представителей обеих линий произошла направленная перестройка морфогенеза, приводящая к определенному фенооблику крыла имаго самцов и самок и быстрой морфологической дивергенции сравниваемых линий. В качестве предварительной гипотезы можно предположить, что быстрые и устойчивые изменения обусловлены направленными эпигенетическими перестройками, приводящими к реконструкции и фиксации траекторий морфогенеза, характерных для особей с различными жизненными стратегиями, имеющих разную продолжительность жизни. С позиций внутривидового полиморфизма эти результаты представляются убедительным доказательством сосуществования внутривидовых групп, различающихся жизненными стратегиями [7–9, 30].

Возможность быстрых эпигенетических и связанных с ними морфогенетических перестроек жилкования крыла *Drosophila melanogaster*, связанных с перемещением мобильных элементов генома у двукрылых насекомых, ранее была продемонстрирована Л.А. Васильевой и др. [31] на примере линии, маркированной мутацией *ri (radius incompletus)*. Показано, что как при направленном искусственном дизруптивном отборе в течение 70 поколений, так и при воздействии тяжелого теплового шока на ранние этапы морфогенеза происходили сходные, неслучайные и направленные перестройки в системе размещения маркированных мобильных элементов (Dm-412) по сайтам хромосом, сопровождающиеся определенными параллельными фенотипическими изменениями [32]. Недавно О.Н. Антосюк была обнаружена аналогичная нестабильность генома *D. melanogaster* в условиях радиационного и химического стресса [33]. Повторяемость этих процессов перемещения мобильных элементов косвенно указывает на то, что они относятся к проявлениям «физиологии генома», которые, вероятно, выработаны исторически и осуществляются с помощью эпигенетических механизмов.

Ранее Ю.М. Никоноровым и Г.В. Беньковской [34] было установлено, что в обеих отбираемых линиях на стадии имаго по сравнению с предыдущей стадией в ДНК существенно возрастает содержание копий транспозона *Hermes*. Распространение ДНК транспозона *Hermes* в геноме комнатной мухи, сопровождающееся увеличением его копийности, может осуществляться

с использованием механизма транспозиции, не нуждающегося в промежуточной эписомной форме [34]. Поэтому имеются основания предполагать, что в нашем случае эффективность отбора и быстрая фиксация межлинейных морфогенетических различий могут быть обусловлены сходными эпигенетическими явлениями. В частности, это возможно и на основе перестроек генома за счет транспозиций мобильных элементов. Дальнейшие сравнительные исследования эпигенетических профилей метилирования ДНК и размещения мобильных элементов по сайтам хромосом у представителей линий смогут прояснить данные вопросы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В итоге проведенного исследования можно заключить, что после искусственного отбора на разную продолжительность жизни имаго комнатной мухи исходной линии *S* в сформированных линиях *Sh gen* и *L gen* морфогенез крыла как у самок, так и у самцов существенно изменился, причем достигнутые при этом межлинейные различия по своей величине оказались значимо больше половых. Высокая устойчивость сохранения фенотипических особенностей крыла, обеспечивающая почти безошибочную идентификацию особей каждой сравниваемой группы мух, указывает на генетическую, а также, возможно, эпигенетическую фиксацию возникших новых особенностей морфогенеза. Предположение об эпигенетическом механизме перестройки морфогенеза основано на том, что селективный процесс сопровождался быстрыми и одновременно массовыми изменениями. Примечательно, что в процессе отбора морфогенетическая дифференциация затронула представителей обоих полов, но при их межлинейном фенотипическом расхождении сохранился параллелизм в направлении половых различий. Произошло значимое уменьшение размера крыльев у мух, отобранных на более продолжительную жизнь имаго. Перестройка морфогенеза крыла в некоторой степени обусловлена также и аллометрическими зависимостями, в частности, у самцов линии *L gen*.

Показатель внутривидового разнообразия (*MNND*) формы крыла у имаго линии *Sh gen* значимо выше, чем линии *L gen*. При этом паттерн разнообразия формы крыла имаго линии *Sh gen* характеризуется значимым эффектом сверхрассеивания (*overdispersion*) ординат, отражающим дестабилизацию развития, а в линии *L gen* он соответствует случайному распределению Пуассона, что косвенно указывает на относительную стабильность протекания морфогенеза (вероятное завершение фиксации морфогенетической траектории).

Таким образом, на основе методов геометрической морфометрии выявлены отдаленные последствия проведенного дизруптивного отбора в линии *S* комнатной мухи, которые указывают на становление существенных устойчивых различий в форме и размерах крыла и про-

текции морфогенеза у сформированных линий *Sh gen* и *L gen* с разной продолжительностью жизни.

Выдвинута гипотеза о том, что обнаруженные морфогенетические перестройки обеих линий могут быть эффектом преадаптации, то есть сформированы на основе исторически сложившегося веера потенциальных онтогенетических траекторий вида, характерных для популяции с подразделенной структурой. Предполагается, что в основе перестроек морфогенеза лежат первичные эпигенетические изменения, позволяющие быстро их «мобилизовать», подхватить и в дальнейшем зафиксировать отбором.

Перечень терминов: дизруптивный отбор — disruptive selection; морфоразнообразие — morphological disparity; комнатная муха — house fly; сверхрассеивание — overdispersion; случайное распределение Пуассона — random Poisson distribution; генерализованный прокрустов анализ — generalized Procrustes analysis (GPA); прокрустовы координаты — Procrustes coordinates; форма — shape; размер центраида — centroid size (CS).

Работа выполнена в рамках государственного задания Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (тема № АААА-А16-11602035003), государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН, а также при частичной поддержке РФФИ (гранты № 16-04-01831, 15-04-04181).

Конфликт интересов: не заявлен.

ЛИТЕРАТУРА

- Brakefield PM. Evo-devo and constraints on selection. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 2006;21(7):362-8. doi: 10.1016/j.tree.2006.05.001.
- Jablonka E, Raz G. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Quart Rev Biol*. 2009;84:131-176. doi: 10.1086/598822.
- Bonduriansky R, Crean AJ, Day T. The implications of nongenetic inheritance for evolution in changing environments. *Evol Appl*. 2012;5:192-201. doi: 10.1111/j.1752-4571.2011.00213.x.
- Mazzio EA, Soliman KFA. Basic concepts of epigenetics. Impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*. 2012;7(2):119-130. doi: 10.4161/epi.7.2.18764.
- Ledón-Rettig CC. Ecological Epigenetics: An Introduction to the symposium. *Integrative and Comparative Biology*. 2013;53:307-318. doi: 10.1093/icb/ict053.
- Duncan EJ, Gluckman P.D, Dearden PK. Epigenetics, plasticity and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? *J Exp Zool. Part B. Molecular and Developmental Evolution*. 2014;322B:208-220. doi: 10.1002/jez.b.22571.
- Benkovskaya G. Opportunities and limitations of changes in lifespan in laboratory experiment. *Advances in Gerontology*. 2011;1(3):255-259. doi: 10.1134/s2079057011030039.
- Беньковская Г.В., Никоноров Ю.М. Ассортативность спаривания и поддержание внутривидового полиморфизма в природных популяциях и лабораторных культурах насекомых // Журнал общей биологии. — 2015. — Т. 76. — № 6. — С. 421–428. [Ben'kovskaya GV, Nikonorov YuM. Assortativnost' sparivaniya i podderzhanie vnutripopulyatsionnogo polimorfizma v prirodnykh populyatsiyakh i laboratornykh kul'turakh nasekomykh. *Zhurnal obshhej biologii*. 2015;76(6):421-428. (In Russ.)]
- Маркина Т.Ю., Беньковская Г.В. Механизмы поддержания гомеостаза в лабораторных популяциях насекомых // Экология. — 2015. — № 4. — С. 294–299. [Markina TY, Benkovskaya GV. Mechanisms of homeostasis maintenance in laboratory populations of insects. *Russian Journal of Ecology*. 2015;46(4):365-9. (In Russ.)]. doi: 10.1134/s1067413615040128.
- Rohlf FJ, Slice D. Extension of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst Zoology*. 1990;39(1):40-59. doi: 10.2307/2992207.
- Quenouille M. Approximate tests of correlation in time series. *Journal of the Royal Statistical Society B*. 1949;11:18-44.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, et al. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier: Acad. Press; 2004. 443 p.
- Klingenberg CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour*. 2011; 11:353-357. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x.
- Adams DC, Otárola-Castillo E. Geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods in Ecology and Evolution*. 2013;4:393-399. doi: 10.1111/2041-210x.12035.
- Sheets HD, Zelditch ML. Studying ontogenetic trajectories using resampling methods and landmark data. *Hystrix. The Italian Journal of Mammalogy*. 2013;24(1):67-74.
- Васильев А.Г., Большаков В.Н., Васильева И.А., и др. Оценка эффектов неизбирательной элиминации в сообществе грызунов методами геометрической морфометрии // Экология. — 2016. — № 4. — С. 290–299. [Vasil'ev AG, Bol'shakov VN, Vasil'eva IA, et al. Assessment of nonselective elimination effects in rodent communities by methods of geometric morphometrics. *Russian Journal of Ecology [Internet]*. 2016 Jul;47(4):383-91. (In Russ.)]. doi: 10.1134/s1067413616040159.
- Rohlf FJ. TpsUtil, file utility program. version 1.60. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook; 2013a (program).
- Rohlf FJ. TpsDig2, digitize landmarks and outlines, version 2.17. Department of Ecology and Evolution,

- State University of New York at Stony Brook; 2013b (program).
19. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4(1):1-9.
 20. Mitteroecker P, Gunz P, Windhager S, Schaefer K. A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. *Hystrix. The Italian Journal of Mammalogy*. 2013;24(1):63-69. doi: 10.4404/hystrix-24.1-63-69.
 21. Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Australian Ecology*. 2001;26:32-46. doi: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.
 22. Дэвис Д.С. Статистический анализ данных в геологии. — Кн. 2. — М.: Недра, 1990. — 427 с. [Devis DS. Statisticheskii analiz dannykh v geologii. Vol. 2. Moscow: Nedra; 1990. 427 p. (In Russ.)]
 23. Hammer Ø. New methods for the statistical analysis of point alignments. *Computers and Geosciences*. 2009;35:659-666. doi: 10.1016/j.cageo.2008.03.012.
 24. Donnelly KP. Simulations to determine the variance and edge effect of total nearest neighbor distance. In: Simulation studies to archeology. Ed by I. Hodder. Cambridge: Cambridge Univ. Press; 1978. P. 91-95.
 25. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 1965;52:591-611.
 26. Hedges LV, Olkin I. Statistical methods for Meta-Analysis. New York: Academic Press; 1985. 369 p.
 27. Cohen J. A power primer. *Psychological Bulletin*. 1992;112(1):155-159. doi: 10.1037/0033-2909.112.1.155.
 28. Васильев А.Г., Васильева И.А. Гомологическая изменчивость морфологических структур и эпигенетическая дивергенция таксонов: основы популяционной мерономии. — М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2009. — 511 с. [Vasil'ev AG, Vasil'eva IA. Gomologicheskaya izmenchivost' morfologicheskikh struktur i epigeneticheskaya divergentsiya taksonov: osnovy populyatsionnoi meronomii. Moscow: Tov-vo nauch. izd. KMK; 2009. 511 p. (In Russ.)]
 29. West-Eberhard MJ. Phenotypic accommodation: Adaptive innovation due to developmental plasticity. *J of Experimental Zool. (Mol Dev Evol)*. 2005;304B: 610-618. doi: 10.1002/jez.b.21071.
 30. Reed DH, Bryant EH. The evolution of senescence under curtailed life span in laboratory populations of *Musca domestica* (the housefly) *J Hered.* 2000;85(2):115-121. doi: 10.1046/j.1365-2540.2000.00737.x.
 31. Васильева Л.А., Юнакович Н., Ратнер В.А., Забанов С.А. Анализ изменений локализации МГЭ дрозофилы после селекции и температурного воздействия методом блот-гибридизации по Саузерну // Генетика. — 1995. — Т. 31. — № 3. — С. 333–341. [Vasil'eva LA, Yunakovich N, Ratner VA, Zabanov SA. Analiz izmenenii lokalizatsii MGE drozofily posle selektsii i temperaturnogo vozdeistviya metodom blot-gibridizatsii po Sauzernu. *Genetika*. 1995;31(3):333-41. (In Russ.)]
 32. Ратнер В.А., Васильева Л.А. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов стрессовыми воздействиями // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6. — № 6. — С. 14–20. [Ratner VA, Vasil'eva LA. Induktsiya transpozitsii mobil'nykh geneticheskikh elementov stressovymi vozdeistviyami. *Sorosovskii obrazovatel'nyi zhurnal*. 2000;6(6):14-20. (In Russ.)]
 33. Антосюк О.Н. Нестабильность генома *Drosophila melanogaster* в условиях радиационного и химического стресса: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Екатеринбург, 2016. — 25 с. [Antosiuk ON. Nestabilnost' genoma *Drosophila melanogaster* v uslovyah radiatsionnogo i khimicheskogo stressa. [dissertation] Ekaterinburg; 2016. 25 p. (In Russ.)]
 34. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В. Механизмы поддержания полиморфизма по продолжительности жизни в лабораторных линиях комнатной мухи // Успехи геронтологии. — 2013. — Т. 26. — № 4. — С. 594–600. [Nikonorov YM, Benkovskaya GV. The mechanisms of lifespan polymorphism maintenance in the house fly laboratory strain. *Advances in Gerontology* [Internet]. Pleiades Publishing Ltd; 2014;4(3):163-8. (In Russ.)]. doi: 10.1134/s2079057014030059.

☞ Информация об авторах

Тансулпан Тимерхановна Ахметкиреева — старший лаборант, лаборатория молекулярной генетики человека. ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН», Уфа. E-mail: Tansulpan.ufa@gmail.com.

Галина Васильевна Беньковская — ведущий научный сотрудник, лаборатория физиологической генетики. ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН», Уфа. E-mail: bengal2@yandex.ru.

Алексей Геннадьевич Васильев — д-р биол. наук, проф. зав. лаб., лаборатория эволюционной экологии. ФГБУН «Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН», Екатеринбург. E-mail: vag@ipae.uran.ru.

☞ Information about the authors

Tansulpan T. Akhmetkireeva — Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Genetic of Human. Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia. E-mail: Tansulpan.ufa@gmail.com.

Galina V. Ben'kovskaya — Dr. Biol. Sci., Leading Researcher, Laboratory of Physiological Genetics. Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia. E-mail: bengal2@yandex.ru.

Aleksei G. Vasil'ev — Dr. Biol. Sci., Prof., Chief of Lab, Laboratory of Evolution Ecology. Institute of Plant and Animal Ecology UB RAS, Yekaterinburg, Russia. E-mail: vag@ipae.uran.ru.