

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА

УДК 595.77, 575.8

На правах рукописи

Яковлева Екатерина Юрьевна

**Эволюционные изменения и фенотипическая пластичность
параметров жизненного цикла *Drosophila melanogaster* под
влиянием различных факторов окружающей среды**

Специальность 1.5.14. – Энтомология

диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Куликов Алексей Михайлович

Москва

2026

Список сокращений и терминов

ПЖ – продолжительность жизни

СВС – средний возраст самки, откладывающей яйца

СКП – суммарный коэффициент плодовитости самок

Drosophila melanogaster, дрозофила и муха в настоящем исследовании используются как синонимы, если в тексте не указано иное.

Когорта – выборка мух одного возраста, содержащаяся в заданных экспериментальных условиях.

Пластические изменения — изменения фенотипа дрозофил в ответ на изменения среды без изменения генотипа, то есть фенотипическая пластичность, или модификационная изменчивость.

Внешняя (экзогенная) смертность – смертность, обусловленная внешними по отношению к организму факторами (хищники, болезни), которые не зависят от его состояния, не связана со старением.

Внутренняя (эндогенная) смертность – смертность, связанная с состоянием организма, старением, мутациями и т. д.

Оглавление

Введение	8
Обзор литературы	20
1. Эволюционные эксперименты	20
2. <i>Drosophila melanogaster</i> как объект исследований	21
3. Особенности жизненных циклов и старения насекомых	24
4. Гипотезы, объясняющие появление и эволюцию старения	29
5. Эволюционные эксперименты по изучению продолжительности жизни	32
6. Адаптация дрозофил к стрессовым условиям среды	35
7. Влияние гетерогенной среды на ход адаптации к стрессовым условиям и изменение параметров жизненного цикла	37
8. Факторы, помимо генетических, влияющие на результаты отбора	41
9. Хологеномная теория эволюции	43
10. Влияние микробиоты на параметры жизненного цикла дрозофил	45
Материалы и методы	52
1. Постановка долгосрочного эволюционного эксперимента	52
1.1. Исходная популяция <i>D. melanogaster</i>	52
1.2. Корма, на которых культивировались мухи, используемые в исследовании	52
1.3. Линии мух, используемые в исследовании и условия их содержания	53
2. Тесты для оценки изменений параметров жизненного цикла <i>D. melanogaster</i> под влиянием различных факторов окружающей среды	55
2.1. Стандартный протокол тестирования мух для оценки ПЖ и возрастной динамики плодовитости самок	56

2.2. Тесты для оценки параметров жизненного цикла дрозофил, адаптированных к обедненному крахмальному корму (гомогенные условия) (Тесты 1–3).....	58
2.3. Тесты для оценки параметров жизненного цикла дрозофил, адаптированных к гетерогенным условиям среды и соленому корму (Тесты 4–7).....	59
2.4. Тесты для оценки влияния дрожжевой микробиоты на параметры жизненного цикла дрозофил (Тесты 8–11).....	62
2.5. Тесты для оценки параметров жизненного цикла дрозофил в результате отбора на позднее размножение (Тесты 12–14).....	67
3. Анализ данных.....	72
3.1. Продолжительность жизни, кривые дожития	72
3.2. Проверка гипотез о вкладе различных факторов в значимые отличия мух по ПЖ, плодовитости и эффективности размножения	73
3.3. Оценка плодовитости.....	74
3.4. Программы для статистической оценки и графического анализа данных	76
Результаты исследования.....	77
1. Изменение продолжительности жизни и возрастной динамики плодовитости дрозофил в ходе адаптации к неблагоприятным кормам (гомогенные условия).....	77
1.1. Продолжительность жизни мух, адаптированных к обедненному крахмальному корму (Тесты 1 и 3).....	77
1.2. Возрастная динамика плодовитости самок мух, адаптированных к обедненному крахмальному корму (Тест 2).....	81
1.3. Продолжительность жизни мух, адаптированных к стрессовому соленому корму (Тест 6, гомогенные условия).....	84

1.4. Возрастная динамика плодовитости самок мух, адаптированных к стрессовому соленому корму (Тест 7, гомогенные условия)	86
2. Оценка приспособленности и изменения продолжительности жизни и возрастной динамики плодовитости дрозофил в ходе адаптации к гетерогенным условиям среды	88
2.1. Эффективность размножения (Тесты 4 и 5)	88
2.2. Продолжительность жизни (Тест 6, гетерогенные условия)	90
2.3. Возрастная динамика плодовитости самок (Тест 7, гетерогенные условия)	92
3. Оценка влияния дрожжевой микробиоты на продолжительность жизни и динамику плодовитости дрозофил	94
3.1. Предварительный посев (Тест 8)	94
3.2. Продолжительность жизни (Тест 9)	95
3.3. Возрастная динамика плодовитости самок (Тест 10)	101
3.4. Состав и структура дрожжевой микробиоты, развивающейся на корме (Тест 11)	104
4. Факторы, вносящие вклад в увеличение продолжительности жизни дрозофил, отбираемых на позднее размножение	106
4.1. Продолжительность жизни в когортах мух линии Ma, отбираемой на позднее размножение	106
4.2. Сопоставление продолжительности жизни мух в контрольной линии (Mn) и линии, отбираемой на позднее размножение (Ma) (Тест 12)	109
4.3. Оценка продолжительности жизни дрозофил в тестировании на совместное проживание (Тест 13)	110
4.4. Сопоставление продолжительности жизни самок с обедненной собственной микробиотой в присутствии микробиоты дрозофил из разных	

линий (Тест 14).....	116
Обсуждение	122
1. Эволюция продолжительности жизни и возрастной динамики плодовитости дрозофил, адаптированных к неблагоприятным кормам (гомогенные условия)	122
1.1. Адаптация дрозофил к обедненному крахмальному корму (гомогенные условия)	122
1.2. Адаптация дрозофил к корму с высоким содержанием соли (гомогенные условия)	130
2. Эволюция параметров жизненного цикла дрозофил, адаптированных к различным кормам в условиях пространственной гетерогенности среды	134
2.1. Показатели приспособленности, возможные причины успешной адаптации, направление отбора	134
2.2. Возможность специализации или генерализации в ходе отбора	142
2.3. Возможный вклад симбиотической микробиоты в адаптацию к соли... ..	144
3. Влияние дрожжевой микробиоты и отдельных ее компонентов на параметры жизненного цикла дрозофил	145
3.1. Роль дрожжей в развитии <i>D. melanogaster</i>	145
3.2. Взаимосвязь между диетой, продолжительностью жизни и динамикой плодовитости	146
3.3. Роль дрозофил в поддержании симбиотического дрожжевого сообщества	151
4. Вклад генетического, социального и микробиологического факторов в увеличение продолжительности жизни дрозофил, отбираемых на позднее размножение	154
4.1. Социальные факторы (связанные с половым поведением)	155

4.2. Микробиологические факторы	156
4.3. Генетические факторы	159
Заключение	162
Выводы	164
Личный вклад автора.....	166
Благодарности.....	167
Список литературы.....	168
Приложение	204

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования и степень разработанности темы

Окружающая среда непрерывно меняется, и организмы адаптируются к ней. Количество плодовитых потомков, произведенных организмом за жизнь, – классический показатель приспособленности, – лишь один из параметров жизненного цикла, который меняется в ходе адаптации. Как и за счет каких механизмов в ходе адаптации изменяются другие параметры жизненного цикла, такие как продолжительность жизни и возрастная динамика плодовитости и смертности, остается гораздо менее изученным вопросом.

Адаптация к условиям внешней среды для насекомых тесно связана с изменчивостью параметров жизненного цикла. Выраженная стадийность развития, метаморфоз и способность многих видов переходить в состояние диапаузы создают широкие возможности для пластических и эволюционных изменений темпов размножения и развития, продолжительности жизни и возрастной динамики смертности и плодовитости. Поэтому изучение данных показателей представляет интерес как для эволюционной биологии, так и для энтомологии.

Для изучения эволюции параметров жизненного цикла и приобретения адаптаций в 2014 г. был начат долгосрочный эволюционный эксперимент на мухах *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae), взятых из природы. Способность популяций этого двукрылого к быстрым изменениям многих признаков под действием отбора, простота культивирования и хорошая изученность вида с точки зрения генетики и особенностей жизненного цикла обуславливают его широкое использование в эволюционных экспериментах. Кроме того, биологические особенности *D. melanogaster* – эврибионтность, синантропность, жизнь на эфемерных субстратах – делают вид ценным объектом энтомологических и экологических исследований, особенно в контексте изучения адаптаций к условиям среды, жизненных стратегий и взаимодействий с микроорганизмами.

Темпы старения и продолжительность жизни у насекомых чрезвычайно разнообразны и могут существенно различаться даже между особями одного вида, например между репродуктивными и рабочими кастами общественных насекомых (Jemielity et al., 2005; Promislow et al., 2022). Однако *D. melanogaster* является стареющим организмом (Jones et al., 2014; Promislow et al., 2022), а старение дрозофил можно охарактеризовать по возрастной динамике смертности и плодовитости. Факторы отбора, лежащие в основе эволюции продолжительности жизни и старения, остаются по сей день дискуссионными и требуют изучения. Снижение продолжительности жизни может быть интерпретировано как полезная адаптация, повышающая эволюционный потенциал популяции (Weismann, 1889; Скулачев, 1999) и поддерживаемая отбором (Longo et al., 2005; Woods et al., 2011; Марков, 2012; Lohr et al., 2019). С другой стороны, сокращение продолжительности жизни можно рассматривать с позиции комплекса идей классической эволюционной теории старения (Hamilton, 1966; Rose, 1991; Kirkwood, 1977), базирующейся на идеях Медавара о снижении эффективности отбора с возрастом особей (Medawar, 1952) и гипотезе Уильямса (Williams, 1957) о наличии аллелей, повышающих приспособленность в молодости ценой снижения приспособленности в позднем возрасте.

Согласно проверяемым следствиям из этих идей высокая неизбирательная внешняя (экзогенная) смертность должна приводить к наследуемому сокращению продолжительности жизни и сдвигу репродукции на ранние сроки (Williams, 1957; Stearns et al., 2000); тогда как избирательная экзогенная смертность (зависящая от состояния организма), напротив, может вести к увеличению продолжительности жизни (Williams, Day, 2003; Chen, Maklakov, 2012). В ряде исследований показано, что адаптация к стрессовым условиям имитирует условия избирательной или неизбирательной смертности, и сложившиеся условия отбора могут влиять на параметры жизненного цикла. На проверку идей об эффекте эндогенной смертности нацелены тестирования дрозофил, адаптировавшихся к стрессовым кормам, крахмальному и соленому, в гомогенных условиях, то есть без

возможности выбора корма.

Снижая шансы особи на долгую жизнь, высокая смертность должна способствовать эволюции ускоренного снижения отдельных компонент приспособленности с возрастом (старения). Отбор на отложенную репродукцию, напротив, должен способствовать повышению продолжительности жизни. Для проверки этой идеи в настоящем исследовании велся отбор дрозофил на размножение в позднем возрасте и тестировалась продолжительность жизни отбираемых мух от поколения к поколению.

Различные экологические факторы могут модулировать характер смертности и отбор на позднюю и раннюю репродукцию. Однако в природе условия повсюду неоднородны. В связи с этим логичным продолжением исследования стало тестирование параметров жизненного цикла дрозофил, адаптировавшихся к тем же стрессовым кормам, крахмальному и соленому, но в условиях возможности выбора между ними. Предполагается, что гомогенная среда, обеспечивая постоянный однонаправленный отбор, способствует экологической специализации (Lynch, Gabriel, 1987), а в пространственно гетерогенных условиях адаптации могут идти по пути как специализации, так и генерализации, что находит отражение в изменении параметров жизненного цикла мух.

Еще одна причина, по которой эволюцию параметров жизненного цикла целесообразно изучать на дрозофилах, связана с особенностями их микробиоты. Лабораторные линии *D. melanogaster* – организмы с относительно простым микробным сообществом, но связи между его компонентами (дрожжами и бактериями), а также с организмом хозяина аналогичны тем, что складываются в более разнообразных природных сообществах (Erkosar et al., 2013; Erkosar, Leulier, 2014; Newell, Douglas, 2014; Hoang et al., 2015; Trinder et al., 2017; Douglas, 2018).

В ряде исследований показан вклад симбиотической микробиоты в приобретение дрозофилами адаптаций и её влияние на параметры жизненного цикла. Чаще всего акцент сделан на бактериальном компоненте (Cooper, 1960; Begon, 1982; Ren et al., 2007; Anagnostou et al., 2010; Gould et al., 2018), хотя дрожжи

также являются неотъемлемой частью микробиоты дрозофил и основным источником пищи личинок и имаго (Cooper, 1960; Begon, 1982; Anagnostou et al., 2010; Ивницкий и др., 2018). Таким образом, взаимодействие дрозофил с дрожжами представляет собой удобную модель для исследования сразу двух тесно связанных аспектов экологии насекомых — трофических и симбиотических связей. Изменение дрожжевого сообщества способно одновременно изменять качество пищевого ресурса и физиологическое состояние хозяина, что может отражаться на продолжительности жизни, возрастной динамике плодовитости и смертности. В серии тестирований нами изучена модификационная изменчивость по продолжительности жизни и плодовитости мух под влиянием дрожжевой микробиоты и отдельных её компонентов, а также роль микробиоты в эволюционных изменениях продолжительности жизни дрозофил.

Следует подчеркнуть, что фокусом работы было изучение долговременных изменений параметров жизненного цикла *D. melanogaster* на стадии имаго в ходе адаптации к различным условиям среды. Природа этих изменений может быть эволюционной в узком смысле (то есть предполагающей только генетические механизмы наследования), эволюционной в широком смысле (то есть подразумевающей также эпигенетические и поведенческие механизмы наследования) или носить характер долговременных фенотипических сдвигов (Futuyma et al., 2017), но анализ механизмов реализации этих изменений выходит за рамки настоящего исследования. В любом случае наблюдаемые в эксперименте адаптивные изменения — начальный этап эволюционных изменений под действием стрессовых факторов среды.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования выступают лабораторные линии плодовой мухи *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae), происходящие от природной популяции и длительно культивируемые в различных условиях среды. Предмет исследования — фенотипическая пластичность и эволюционные

изменения параметров жизненного цикла *D. melanogaster* на стадии имаго, включая продолжительность жизни, возрастную динамику смертности и плодовитости и эффективность размножения, под влиянием трофических условий, пространственной гетерогенности среды, ассоциированной микробиоты и отбора на отложенную репродукцию.

Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования – выявление закономерностей эволюции параметров жизненного цикла *Drosophila melanogaster* под действием различных факторов отбора и прояснение роли симбиотической микробиоты в эволюционных изменениях и фенотипической пластичности продолжительности жизни и плодовитости.

Для достижения поставленной цели в работе решаются следующие задачи:

1. Протестировать изменения параметров жизненного цикла линий *D. melanogaster*, адаптированных к неблагоприятным трофическим условиям (обедненному крахмальному корму и корму с повышенным содержанием соли) в гомогенных условиях;
2. Оценить влияние пространственной гетерогенности среды (возможность выбора между крахмальным и солёным кормом) на параметры жизненного цикла в ходе адаптации *D. melanogaster* к этим неблагоприятным трофическим условиям;
3. Протестировать влияние дрожжевого симбиотического сообщества и отдельных его компонентов на параметры жизненного цикла дрозофил путем сопоставления линии мух с обедненной дрожжевой микробиотой и контрольной линии, сохраняющей естественную микробиоту;
4. Оценить изменение продолжительности жизни имаго в линии мух, отбираемой на позднее размножение, и определить вклад генетического и микробиологического факторов в наблюдаемые изменения по продолжительности жизни.

Методы исследования

В работе применялись методы эволюционных экспериментов на модельном организме плодовой мухе *D. melanogaster*, методы микробиологического посева, статистические методы анализа данных и графические методы их представления.

Научная новизна работы

В настоящем исследовании представлены результаты долгосрочного эволюционного эксперимента по адаптации к неблагоприятным условиям среды лабораторных линий *D. melanogaster*, недавно произведенных от природной популяции (Марков и др., 2015, 2016). Полученные аутбредные линии дрозофил характеризовались генетическим разнообразием, свойственным для диких популяций, что позволяло вести отбор в различных условиях среды или по определенным признакам. Благодаря данному эксперименту прояснен вопрос о характере влияния неизбирательной и избирательной смертности на изменение продолжительности жизни, что сделано на *D. melanogaster* впервые.

В работе впервые изучается влияние пространственной гетерогенности среды на эволюцию параметров жизненного цикла в условиях адаптации к неблагоприятным условиям. Ранее изучалось лишь влияние временной гетерогенности среды на ход адаптациогенеза многоклеточных организмов, и не затрагивался вопрос изменения параметров жизненного цикла в подобных условиях.

В исследовании продемонстрированы существенные пластические изменения параметров жизненного цикла макроорганизма под действием неизученных ранее компонентов его дрожжевой микробиоты. Впервые показано, что эволюционные изменения продолжительности жизни могут происходить не только и не столько за счет генетического состава подопытной популяции макроорганизмов (как предполагают классические эволюционные модели), сколько за счет изменений микробиоты, которая также подвергается отбору и может существенно влиять на продолжительность жизни хозяина. Данный результат согласуется с хологеномной теорией эволюции, согласно которой в

качестве единицы отбора следует рассматривать не изолированный организм, а многоклеточный организм и ассоциированную с ним микробиоту.

Теоретическая и практическая значимость работы

Продолжительность жизни, плодовитость и эффективность размножения являются показателями приспособленности, поэтому понимание механизмов их эволюции под действием различных факторов отбора проясняет ключевой вопрос эволюционной биологии о механизмах приобретения адаптаций.

D. melanogaster является одной из наиболее разработанных моделей старения насекомых, поэтому выявленные закономерности позволяют формулировать гипотезы о механизмах эволюции продолжительности жизни и динамики размножения у других насекомых со схожим типом жизненного цикла.

Эскалация климатических изменений, инвазионных процессов, усиливающееся техногенное загрязнение и аккумуляция негативного антропогенного влияния на природную среду, ускоряющаяся потеря биологического разнообразия ведут к резким изменениям условий среды обитания во многих регионах мира, что должно способствовать ускорению эволюционных перестроек. В этих условиях практическая значимость работы состоит в лучшем понимании и умении прогнозировать, какими путями и за счет каких механизмов может происходить быстрая адаптация организмов к меняющимся условиям среды. Симбиотические микроорганизмы имеют более короткий жизненный цикл, чем организм хозяина, и могут первыми приспосабливаться к стрессовым условиям, тем самым определяя вектор адаптации макроорганизма. Исследования на *D. melanogaster* позволяют выявить закономерности этих процессов и сформулировать подходы к их изучению у других насекомых.

Положения, выносимые на защиту

1. Адаптация мух *D. melanogaster* к двум неблагоприятным кормам (крахмальному и соленому) приводит к разному характеру изменений параметров жизненного цикла: на крахмальном корме сокращается продолжительность жизни,

повышается ранняя плодовитость (измерена как количество отложенных самками яиц) и ускоряется репродуктивное старение самок, а на соленом корме – изменений не наблюдается. Это обусловлено разным характером смертности: на соленом корме смертность более избирательная, чем на крахмальном.

2. Пространственная гетерогенность среды с возможностью выбора между двумя неблагоприятными кормами (крахмальным и соленым) вызывает миграционную активность и способствует адаптации дрозофил сразу к обоим кормам (генерализации), что проявляется в увеличении продолжительности жизни и сдвиге репродукции на более поздний возраст по сравнению с мухами контрольной линии и мухами, адаптирующимися к тем же неблагоприятным кормам в гомогенных условиях.
3. Дрожжи вступают в длительную ассоциацию с дрозофилами, и характер их взаимодействия не транзитный. Подавление дрожжевой микробиоты мух ведет к росту средней продолжительности жизни, снижению плодовитости и сдвигу ее на более поздний возраст, что не позволяет достичь той же суммарной плодовитости, что и у мух в присутствии дрожжей.
4. Отбор мух *D. melanogaster* на позднее размножение приводит к значительному росту продолжительности жизни в отбираемой популяции не только за счет генетического состава подопытной популяции макроорганизмов, но и вследствие изменения микробиоты, которая также подвергается отбору.

Степень достоверности полученных результатов

Полученные в работе выводы основываются на результатах долгосрочного эволюционного эксперимента, серии из 14 тестирований лабораторных линий дрозофил, а также анализе обширных литературных данных. В работе применены методы статистического анализа, которые соответствуют задачам и специфике полученных данных, объем данных достаточен для решения поставленных задач. Это позволяет говорить о высокой степени достоверности результатов исследования.

Апробация полученных результатов

Основные положения работы представлены на российских и международных научных конференциях:

1. Ecology and Evolutionary Biology Symposium, İstanbul 2023, Стамбул, Турция, 17–19 июля 2023, стендовый доклад;
2. Современные проблемы биологической эволюции 17–20 октября 2022 г., Москва, Россия, 17–20 октября 2022, стендовый доклад;
3. XVI съезд Русского энтомологического общества, Биологический факультет МГУ, Россия, 22–26 августа 2022, устный доклад;
4. Ломоносовские чтения – 2022, МГУ, Россия, 18–20 апреля 2022, устный доклад;
5. Ломоносовские чтения 2021, Москва, Россия, 20–29 апреля 2021, устный доклад;
6. The 2019 Congress of the European Society for Evolutionary Biology (ESEB 2019), Турку, Финляндия, 19–24 августа 2019, устный доклад;
7. 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, Россия, 15–19 апреля 2019, устный доклад;
8. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», Москва, Россия, 11 апреля 2019, устный доклад;
9. The Jyväskylä Winter School of Ecology. Workshop "Molecular Evolution: Patterns and Causes", Konnevesi, Йювяскюля, Финляндия, 20–22 февраля 2019, стендовый доклад;
10. 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, Россия, 23–27 апреля 2018, устный доклад.

Публикации автора по теме диссертации

По результатам работы опубликовано 11 печатных работ, из них 4 — в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, индексируемых в базах данных Web of Science и/или Scopus, 7 — в материалах международных и всероссийских конференций.

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, индексируемых в базах данных Web of Science и/или Scopus:

1. Яковлева Е.Ю., Максимова И.А., Мерзликин Д.С., Качалкин А.В., Марков А.В. Влияние разных видов дрожжей на продолжительность жизни и плодовитость *Drosophila melanogaster* // Журнал общей биологии. — 2024. — Т. 85, № 3. — С. 165–186. DOI: 10.31857/S0044459624030013, EDN: VDKRHE
2. Яковлева Е.Ю., Мерзликин Д.С., Завьялов А.Е., Маслов А.А., Миронова Е.А., Марков А.В. Вклад генов и симбиотической микробиоты в увеличение продолжительности жизни мух *Drosophila melanogaster*, отбираемых на позднее размножение // Журнал общей биологии. — 2022. — Т. 83, № 4. — С. 268–287. DOI: 10.31857/S004445962204008X
3. Горшкова А.А., Фетисова Е.С., Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние пространственной гетерогенности среды на адаптацию *Drosophila melanogaster* к неблагоприятным кормовым субстратам: результаты эволюционного эксперимента // Журнал общей биологии. — 2018. — Т. 79, № 1. — С. 3–17. EDN: YKWEUY
4. Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние адаптации *Drosophila melanogaster* к неблагоприятному кормовому субстрату на продолжительность жизни и возрастную динамику плодовитости // Биохимия. — 2016. — Т. 81, № 12. — С. 1721–1739. EDN: XGYNVR

Тезисы и материалы конференций:

1. Яковлева Е.Ю., Мерзликин Д.С., Завьялов А.Е., Маслов А.А. Вклад симбиотической микробиоты в изменение продолжительности жизни мух *Drosophila melanogaster*, отбираемых на позднее размножение //

- Современные проблемы биологической эволюции: материалы IV Международной конференции к 875-летию Москвы и 115-летию со дня основания Государственного Дарвиновского музея. 17–20 октября 2022, г. Москва. — ГДМ Москва: 2022. — С. 95–97.
2. Яковлева Е.Ю., Мерзликин Д.С. Результаты отбора мух *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae) на долголетие с точки зрения хологеномной теории эволюции // XVI съезд Русского энтомологического общества. Москва, 22–26 августа 2022 г. Тезисы докладов. 164 с / Под ред. А. А. Антоновской, К. Б. Гонгальского, О. Г. Горбунова и др. — Москва: Общество с ограниченной ответственностью Товарищество научных изданий КМК, 2022. — С. 56.
 3. Мерзликин Д.С., Яковлева Е.Ю., Миронова Е.А. Влияние социальных, микробиотических и генетических факторов на эволюцию продолжительности жизни мух *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2021 / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2021.
 4. Яковлева Е.Ю., Дмитриева А.С., Максимова И.А., Марков А.В. Роль дрожжевой микробиоты в адаптации двукрылых к субстратам с повышенным содержанием NaCl // XI Всероссийский диптерологический симпозиум (с международным участием), Воронеж, 24–29 августа 2020 г.: сборник материалов. — Санкт-Петербург: Русское энтомологическое общество: ООО Издательство “ЛЕМА”: 2020. — С. 266–270.
 5. Яковлева Е.Ю. Эволюция жизненного цикла *Drosophila melanogaster* Meig. (Diptera, Drosophilidae) в результате адаптации к неблагоприятным кормовым субстратам // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2019 / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс]. – М: МАКС Пресс, 2019.

6. Яковлева Е.Ю. Эволюция параметров жизненного цикла *Drosophila melanogaster* в результате отбора на позднее размножение // Сборник тезисов 23-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых Биология – наука XXI века. — 2019. — С. 68–69.
7. Яковлева Е.Ю., Горшкова А.А., Фетисова Е.А. Адаптация *Drosophila melanogaster* к пространственно гетерогенной среде с неблагоприятными кормовыми субстратами: результаты эволюционного эксперимента // Сборник тезисов 22-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых Биология – наука XXI века. — г. Пущино: 2018. — С. 408.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ¹

1. Эволюционные эксперименты

Эволюционные эксперименты — один из мощных инструментов, позволяющих изучать закономерности эволюции различных признаков, связанных с приспособленностью (Kawecki et al., 2012).

История эволюционных экспериментов насчитывает более века. Согласно исследованию Сильвертауна и соавторов (Silvertown et al., 2006) начало одного из первых эволюционных экспериментов на примере парковой травы может датироваться 1856 г., а в 1892 г. вышла книга под названием «Экспериментальная эволюция» («Experimental Evolution»), в которой предлагалась методология, позволяющая разрешить споры между сторонниками теории эволюции Дарвина и Ламарка (цит. по Kawecki et al., 2012). С тех пор экспериментальное изучение эволюции получило обширное применение для поиска ответов на широкий круг эволюционных вопросов, а возможности работы с геномами подстегнули развитие данной области знаний и позволили пролить свет на генетический и молекулярный базис эволюционных изменений.

Чаще всего эволюционные эксперименты проводятся на хорошо изученных модельных объектах (Kawecki et al., 2012), это имеет ряд преимуществ: позволяет интегрировать знания из разных областей, полученные для изучаемого объекта, а также использовать накопленные геномные данные и разработанные методы для

¹ При написании параграфов 1, 4-10 настоящего раздела частично использовались обзоры литературы, представленные в следующих статьях автора:

Яковлева Е.Ю., Максимова И.А., Мерзликин Д.С., Качалкин А.В., Марков А.В. Влияние разных видов дрожжей на продолжительность жизни и плодовитость *Drosophila melanogaster* // Журнал общей биологии. — 2024. — Т. 85, № 3. — С. 165–186. DOI: 10.31857/S0044459624030013, EDN: VDKRHE

Яковлева Е.Ю., Мерзликин Д.С., Завьялов А.Е., Маслов А.А., Миронова Е.А., Марков А.В. Вклад генов и симбиотической микробиоты в увеличение продолжительности жизни мух *Drosophila melanogaster*, отбираемых на позднее размножение // Журнал общей биологии. — 2022. — Т. 83, № 4. — С. 268–287. DOI: 10.31857/S004445962204008X

Горшкова А.А., Фетисова Е.С., Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние пространственной гетерогенности среды на адаптацию *Drosophila melanogaster* к неблагоприятным кормовым субстратам: результаты эволюционного эксперимента // Журнал общей биологии. — 2018. — Т. 79, № 1. — С. 3–17. EDN: YKWEUY

Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние адаптации *Drosophila melanogaster* к неблагоприятному кормовому субстрату на продолжительность жизни и возрастную динамику плодовитости // Биохимия. — 2016. — Т. 81, № 12. — С. 1721–1739. EDN: XGYNVR

работы с ними. В последнее несколько десятилетий в качестве объектов эволюционных экспериментов стали широко использоваться микроорганизмы, такие как вирусы (Elena et al., 2008), в том числе бактериофаги (Doore, Fane, 2016); бактерии (Bennett, Hughes, 2009; Kussell, 2013), в том числе кишечная палочка *Escherichia coli* (Lenski, 2017) и бактерия *Bacillus subtilis* (Zeigler, Nicholson, 2017), и даже целые бактериальные сообщества (Steenackers et al., 2016); пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (Zeyl, 2006) и даже везикулы для изучения эволюции клетки (Sugiyama et al., 2018). Однако, классические модельные объекты эволюционной биологии, такие как дрозофилы (*D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *D. virilis*, *D. simulans*, *D. serrata* и т.д.), нематоды (*Caenorhabditis elegans*, *C. remanei*), дафнии (в том числе *Daphnia magna*), резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana*) также не теряют своей актуальности (Burke, Rose, 2009; Kawecki et al., 2012; Gray, Cutter, 2014).

2. *Drosophila melanogaster* как объект исследований

В настоящем исследовании в качестве объекта эволюционного эксперимента используется плодовая мушка *D. melanogaster*, ставшая излюбленным модельным объектом эволюционных биологов и генетиков с начала XX в. (Markow, 2015) за ряд преимуществ, среди которых короткий жизненный цикл, простота содержания, хорошо изученный геном небольшого размера. Размеры дрозофилы позволяют содержать десятки популяций с эффективной численностью порядка 10^3 , что дает возможность поддерживать генетическое разнообразие и смягчать эффект генетического дрейфа в экспериментах с отбором (Burke, Rose, 2009).

Несмотря на сложившееся восприятие *D. melanogaster* преимущественно как генетической модели, биологические особенности вида делают его также ценным объектом энтомологических исследований, особенно в контексте изучения адаптаций к условиям среды, жизненных стратегий, параметров жизненного цикла и взаимодействий с микроорганизмами (Markow, O'Grady, 2006; Arias-Rojas, Iatsenko, 2022)

D. melanogaster является космополитным синантропным видом, и в связи с этим в значительной степени эврибионтным. *D. melanogaster* ассоциирована преимущественно с разлагающимися растительными субстратами, богатыми дрожжами и бактериями. Такие субстраты часто являются эфемерными. Личинки развиваются в субстрате, где микроорганизмы играют ключевую роль в их питании, при этом личинки в свою очередь могут влиять на состав развивающегося микробного сообщества (Markow, O'Grady, 2006; Stamps et al., 2012).

Микробиота дрозофил передаётся как вертикально – от родителей потомству, так и горизонтально, от одной особи к другой через корм. Для *D. melanogaster* показано, что микроорганизмы с поверхности тела самки могут попадать на хорион яйца при откладке. После вылупления личинки контактируют с этими микроорганизмами и могут заглатывать их вместе с оболочкой яйца, что способствует заселению кишечника (Wong et al., 2015). Бактериальная компонента микробиоты также способствует сохранению дрожжей при переходе от личиночной стадии к имаго (Guilhot et al., 2021). Вместе с тем важным механизмом поддержания микробиоты в популяциях дрозофил является её повторное приобретение из субстрата, ранее заселённого родительскими особями (Blum et al., 2013).

В многочисленных экспериментах показано, что симбиотическая микробиота играет важную роль в жизни дрозофил, как на личиночной стадии, так и на стадии имаго (Starmer, 1981; Starmer et al., 1986; Storelli et al., 2011; Ridley et al., 2012; Дмитриева и др., 2016; Панченко и др., 2017; Ивницкий и др., 2018; Klepsatel et al., 2018; Mure et al., 2023). Причем дрожжи являются важным, если не основным, источником питания дрозофил как на личиночной, так и на имагинальной стадиях жизненного цикла (Cooper, 1960; Begon, 1982; Anagnostou et al., 2010; Mure et al., 2023). Микробиота содержится не только в пищеварительном тракте мухи, но и на поверхности тела, и важна не только для питания и пищеварения (Cooper, 1960; Ryu et al., 2010; Ridley et al., 2012), но и влияет на выживание, иммунитет, устойчивость к токсинам, темпы личиночного развития и

эффективность использования питательных веществ (Ryu et al., 2010; Blum et al., 2013; Erkosar et al., 2013; Sannino et al., 2018; Kosakamoto et al., 2020; Chandler et al., 2022; Onuma et al., 2023; Mure et al., 2023). Микробиота оказывает влияние даже на поведение (Schretter et al., 2018) в том числе при выборе брачного партнера (Markov et al., 2009; Sharon et al., 2010; Leftwich et al., 2018). В ряде исследований показано, что ассоциированная микробиота меняется с возрастом (Ren et al., 2007; Claesson et al., 2011; Smith et al., 2017; Lee et al., 2019; Дмитриева и др., 2021), влияет на ПЖ и возрастную динамику плодовитости и смертности (Starmer, 1981; Starmer et al., 1986; Chippindale et al., 1993; Brummel et al., 2004; Ren et al., 2007; Anagnostou et al., 2010; Дмитриева и др., 2016; Панченко и др., 2017; Ивницкий и др., 2018; Gould et al., 2018; Klepsatel et al., 2018; Dmitrieva et al., 2019; Arias-Rojas, Iatsenko, 2022; Zhang et al., 2023).

Жизненный цикл *D. melanogaster* характеризуется короткой продолжительностью и высокой пластичностью: при оптимальных условиях развитие от яйца до имаго занимает около 10 дней, а продолжительность жизни имаго варьирует в широких пределах в зависимости от факторов среды (в диких популяциях) и условий эксперимента (в лабораторных линиях). Вид отличается высокой плодовитостью и является типичным r-стратегом, а плодовитость имеет выраженную возрастную динамику: пик откладки яиц, как правило, приходится на более ранний возраст самок (Powell, 1997; Markow, O'Grady, 2006). Кроме того, *D. melanogaster* является стареющим организмом, то есть вероятность смерти с возрастом возрастает (Jones et al., 2014). В связи с этим дрозофила – широко применяемый организм для исследования механизмов эволюции параметров жизненного цикла и эволюции старения.

Экспериментальные популяции *D. melanogaster* отличаются способностью к быстрой адаптации к различным факторам среды. Еще Конрад Уоддингтон в середине XX века в своих экспериментах на дрозофилах показал, что за несколько десятков поколений мухи могут адаптироваться к высоким концентрациям соли в корме, тогда как в природе вид вообще не встречается на соленых субстратах

(Waddington, 1959).

Линии дрозофил, использующиеся в настоящей работе, получены из природы, они аутбредны и с высокой вероятностью сохранили генетическое разнообразие, характерное для диких популяций, поэтому отбор в различных условиях среды или по определенным признакам должен быть эффективным. Благодаря этому удастся прояснить вопрос о связи внешней смертности с эволюцией ПЖ в природе, а адаптация популяций дрозофил к тем или иным неблагоприятным кормам – это реалистичная лабораторная модель, имитирующая естественные эволюционные процессы при сменах природных обстановок. При этом адаптивные изменения могут быть обусловлены как генетическими факторами, так и перестройками симбиотических микробных сообществ (Ивницкий и др., 2018; Rudman et al., 2019).

Таким образом, *D. melanogaster* представляет собой не только удобную лабораторную модель, но и объект для эволюционных и энтомологических исследований, в котором генетические, эпигенетические, экологические и микробиологические аспекты тесно взаимосвязаны. Учет этих особенностей позволяет более корректно интерпретировать изменения продолжительности жизни, смертности и плодовитости в экспериментальных популяциях и рассматривать их как результат взаимодействия генетических механизмов и факторов среды, включая трофические условия и микробиоту.

3. Особенности жизненных циклов и старения насекомых

Насекомые характеризуются высоким разнообразием жизненных циклов, продолжительности жизни и стратегий размножения. Говоря о старении насекомых, стоит выделять так называемое актуарное, или демографическое, старение, проявляющееся в увеличении вероятности смерти с возрастом, и репродуктивное старение, выражающееся в возрастном снижении репродуктивной функции (Promislow et al., 2022). Таким образом, ПЖ сама по себе не является непосредственной мерой скорости старения: сходная ПЖ может сочетаться с

различной возрастной динамикой смертности, и, наоборот, увеличение ПЖ не обязательно означает пропорциональное замедление всех возрастных изменений, поэтому важно рассматривать разные параметры жизненного цикла насекомых в комплексе.

У насекомых ПЖ варьирует в чрезвычайно широких пределах — от нескольких суток у короткоживущих имаго до многих лет, например у периодических цикад рода *Magicicada*, и даже десятилетий у отдельных каст общественных насекомых (Promislow et al., 2022). Значительные различия могут наблюдаться и внутри одного вида. Например, у медоносной пчелы матки и рабочие особи обладают в основном одинаковым геномом, однако матки одновременно отличаются высокой плодовитостью и живут во много раз дольше рабочих особей (Jemielity et al., 2005; Kramer et al., 2016). Следовательно, характерная для многих животных отрицательная связь между интенсивностью размножения и ПЖ у насекомых не является универсальной. Разнообразие жизненных стратегий насекомых позволяет изучать не только общие закономерности старения, но и эволюционные изменения связи между размножением, поддержанием соматических функций и ПЖ.

Специфика старения насекомых тесно связана с особенностями их онтогенеза. У насекомых с полным превращением жизненный цикл разделен на морфологически, физиологически и экологически различающиеся личиночную, куколочную и имагинальную стадии. Метаморфоз сопровождается глубокой перестройкой организма, причем многие личиночные ткани разрушаются или существенно реорганизуются, а структуры имаго формируются заново или из специализированных клеточных зачатков (Truman, Riddiford, 2019). Поэтому хронологический возраст и процессы старения у насекомых с полным превращением нельзя рассматривать независимо от стадии онтогенеза.

Вопрос о старении личинок изучен значительно хуже, чем старение имаго. Имеющиеся данные не позволяют утверждать ни то, что личинки насекомых не стареют, ни то, что их старение аналогично старению взрослых особей.

Проводились эксперименты на *D. melanogaster*: при искусственном сильном продлении третьего личиночного возраста клетки личиночного эпидермиса не приобретали характерных для стареющего эпидермиса имаго изменений. Однако при экспериментальном сохранении тех же клеток после метаморфоза в организме взрослой мухи у них проявлялись признаки возрастных изменений (Wang et al., 2021). Эти результаты указывают на выраженную стадийную специфичность по крайней мере некоторых процессов старения у насекомых. В то же время условия, пережитые на личиночной стадии, могут определять признаки взрослой особи, включая ее размеры, репродуктивные возможности и ПЖ.

У автогенного комара *Ochlerotatus atropalpus* качество питания личинок существенно влияет на размеры взрослых самок, количество накопленных белков, жиров и углеводов и число производимых ими яиц (Telang, Wells, 2004). Пищевые ресурсы определяют не только скорость роста и развития, но и распределение ресурсов между поддержанием жизнеспособности организма и размножением. У *D. melanogaster*, например, оптимальное соотношение белков и углеводов различается для ПЖ и интенсивности яйцекладки: максимум ПЖ наблюдался при значительно меньшей доле белка в рационе, чем максимум ранней плодовитости (Lee et al., 2008). Следовательно, воздействие корма на продолжительность жизни нельзя свести только к его общей калорийности — значение имеет качественный состав пищевого ресурса и связанный с ним баланс между размножением и ПЖ.

Еще более выраженная связь между особенностями питания, размножением и долголетием обнаружена у бабочек рода *Heliconius*. В отличие от большинства чешуекрылых, их имаго способны получать аминокислоты из пыльцы, что обеспечивает возможность длительного поддержания репродуктивной функции. В сравнительном исследовании трибы *Heliconiini* показано, что возникновение питания пыльцой у *Heliconius* сопровождалось примерно трехкратным эволюционным увеличением ПЖ по сравнению с близкими видами и замедлением демографического и ряда физиологических проявлений старения; максимальная зарегистрированная ПЖ некоторых особей приближалась к одному году (Foley et

al., 2026). Таким образом, изменения трофических связей могут сопровождаться глубокими эволюционными перестройками жизненного цикла, включая продолжительность репродуктивного периода и темпы старения.

Связь между стадией онтогенеза и размножением также не является у насекомых абсолютно жесткой. Хотя у большинства видов размножение происходит после достижения имагинальной стадии, в нескольких группах независимо возник педогенез — размножение личинок или куколок. В частности, у некоторых галлиц (Diptera, Cecidomyiidae) развитие яичников и образование потомства происходят уже в личиночном состоянии; показано, что возникновение педогенеза связано с изменением сроков гормональной регуляции развития репродуктивной системы (Hodin, Riddiford, 2000). Другой вариант изменения обычного соотношения между развитием и репродуктивной зрелостью наблюдается у червецов и щитовок (Hemiptera, Coccoomorpha), для которых характерен резко выраженный половой диморфизм: самцы проходят глубокий метаморфоз, тогда как половозрелые самки остаются бескрылыми и сохраняют комплекс ювенильных признаков (Gullan, Kosztarab, 1997). Подобные примеры показывают, что у насекомых достижение репродуктивной зрелости, морфологический переход к типичному имаго и хронологический возраст могут быть в значительной степени разобщены. Это необходимо учитывать при сравнительном анализе старения представителей разных групп.

Наглядно пластичность продолжительности жизни насекомых проявляется при диапаузе. В зависимости от вида диапауза может приходиться на стадию яйца, личинки, куколки или имаго и представляет собой регулируемую приостановку развития, сопровождающуюся комплексом физиологических изменений, обеспечивающих переживание неблагоприятного периода (Tatar, Yin, 2001; Nutfilz, 2022). У взрослых насекомых репродуктивная диапауза особенно тесно связана со старением. В этот период тормозятся процессы оогенеза и размножения и одновременно увеличивается продолжительность жизни. У *D. melanogaster*, содержащихся в условиях, вызывающих репродуктивный покой, после

нескольких недель такого состояния смертность после возвращения к обычным условиям содержания была близка к смертности недавно вышедших из куколок мух. Это интерпретировано авторами как свидетельство крайне медленного старения во время репродуктивного покоя (Tatar et al., 2001). Диапауза, таким образом, показывает, что темп старения насекомого не является жестко заданной функцией хронологического времени, а способен существенно меняться в зависимости от физиологического состояния и условий среды.

Несмотря на существовавшее ранее представление о том, что большинство насекомых в природе погибает от внешних причин раньше, чем успевает состариться, полевые исследования выявили актуарное и репродуктивное старение у представителей различных групп, включая двукрылых, прямокрылых, стрекоз и чешуекрылых (Zajitschek et al., 2020; Promislow et al., 2022). Вместе с тем выраженность старения значительно различается между видами, полами и условиями среды, а в некоторых природных популяциях статистически значимого возрастного увеличения смертности выявить не удастся (Jones et al., 2014). Поэтому противопоставление стареющих и нестареющих видов насекомых является упрощением, более информативно сравнивать возраст начала и скорость демографического и репродуктивного старения.

D. melanogaster занимает в исследованиях старения насекомых особое положение благодаря возможности одновременно анализировать демографические, физиологические, генетические и микробиологические показатели и проводить контролируемые эволюционные эксперименты на большом числе поколений. Исследования на дрозофилах позволили установить многие общие закономерности связи питания, размножения, условий среды и продолжительности жизни. Вместе с тем прямой перенос конкретных количественных результатов на всех насекомых делать не стоит из-за высокого разнообразия типов развития, продолжительности отдельных стадий, способов диапаузы, трофических специализаций и репродуктивных стратегий (Promislow et al., 2022). Результаты, полученные на *D. melanogaster*, следует рассматривать

прежде всего как основу для формулирования общих гипотез о механизмах пластических и эволюционных изменений жизненного цикла, которые затем могут проверяться на других группах насекомых.

Таким образом, старение у насекомых представляет собой один из изменчивых параметров жизненного цикла, тесно связанный с особенностями онтогенеза, размножения и взаимодействия с факторами внешней среды. Метаморфоз, диапауза, разнообразие репродуктивных стратегий и трофических связей создают у насекомых особенно широкий спектр вариантов соотношения между продолжительностью жизни и размножением. Это делает насекомых удобной группой как для сравнительного изучения эволюции старения, так и для экспериментального анализа факторов, способных изменять возрастную динамику смертности и плодовитости.

4. Гипотезы, объясняющие появление и эволюцию старения

Продолжительность жизни (ПЖ) и возрастная динамика плодовитости и смертности, с одной стороны, характеризуют приспособленность организма к тем или иным условиям среды, а с другой – приближают к пониманию такого важного вопроса как эволюция старения. Ведь старение – основной фактор, лимитирующий продолжительность жизни для большинства видов животных и человека (Михайлова и др., 2017).

Параметры жизненного цикла подвержены наследственной изменчивости, то есть наблюдаемая изменчивость по этим параметрам (как в природных популяциях организмов, так и в лабораторных линиях) отчасти объясняется генетическими различиями между особями. Благодаря этому параметры жизненного цикла могут эволюционировать под действием отбора.

Существует большое количество гипотез и теорий, объясняющих появление и эволюцию такого фенотипического признака как старение, но не одна из них не является исчерпывающей. В конце XIX в. Август Вейсман одним из первых применил эволюционный подход к проблеме старения (Rose et al., 2008). Он считал,

что старение может быть интерпретировано как полезная адаптация, появившаяся под действием отбора (Weismann, 1889). Далее эта мысль получила свое развитие и сейчас включается в круг идей, рассматривающих старение как программу, повышающую эволюционный потенциал популяции (Скулачев, 1999; Longo et al., 2005) и поддерживаемую родственным отбором (Марков, 2012; Lohr et al., 2019), групповым отбором или «отбором второго порядка на эволюционную перспективность» (Woods et al., 2011).

Другой комплекс идей рассматривает старение, скорее, как неизбежный побочный продукт эволюции. Он опирается на так называемую классическую эволюционную теорию старения (Hamilton, 1966; Rose, 1991; Gavrilov, Gavrilova, 2002) и базируется на гипотезе Уильямса (Williams, 1957). В основе гипотезы лежит идея Медавара (Medawar, 1952) о снижении эффективности отбора с возрастом особей (начиная с достижения половой зрелости): чем меньше индивидов доживает до данного возраста, тем слабее действие отбора (и сильнее действие дрейфа) на мутации, вредный эффект которых проявляется позже этого возраста. Это способствует накоплению вредных мутаций с поздним эффектом, особенно если они срабатывают по окончании периода активного размножения, когда сила отбора приближается к нулю. Уильямс, однако, обратил внимание на то, что у многих видов жизнеспособность начинает снижаться еще в таком возрасте, до которого доживают многие особи, и задолго до потери способности к размножению. Это трудно объяснить одним лишь пассивным (за счет дрейфа) накоплением мутаций, поскольку сила отбора против вредных мутаций, проявляющихся в репродуктивном возрасте, ненулевая. Поэтому Уильямс предположил, что важным фактором эволюции старения является антагонистическая плейотропия аллелей, по-разному влияющих на приспособленность в разном возрасте. Аллели, повышающие плодовитость или иные компоненты приспособленности в молодости ценой снижения приспособленности в позднем возрасте, будут поддержаны отбором, несмотря на свои вредные эффекты, потому что отбор сильнее действует на признаки, проявляющиеся в начале взрослой жизни (Williams,

1957). Далее в 1966 г. Уильям Гамильтон доказал математически, что сила действия естественного отбора снижается с возрастом (Hamilton, 1966), а в 1970-х Брайан Чарльзуорт (Charlesworth) разработал математический аппарат популяционной генетики, применимый для анализа эволюции старения (Charlesworth, Williamson, 1975). Расширением теории антагонистической плейотропии можно считать теорию «одноразовой сомы» (Disposable soma), подразумевающую компромисс (trade-off) между вложением ресурсов в более активное размножение и затратами на поддержание долгой жизни. Последствием повышенной плодовитости является старение (более быстрое ухудшение жизненных функций с возрастом), проявляющееся в виде роста уровня смертности с возрастом и ограниченной продолжительности жизни, даже в отсутствие внешних причин (Kirkwood, 1977; Reichard, 2016).

Если эволюция старения действительно связана с ослаблением отбора с возрастом, то можно ожидать выполнения некоторых очевидных следствий из этого утверждения. К ним относится эффект высокой экзогенной смертности, вызванной, например, прессом хищников или инфекциями. Снижая шансы особи на долгую жизнь, высокая смертность должна способствовать эволюции ускоренного снижения приспособленности с возрастом (старения). Это ведет к наследуемому сокращению средней ПЖ даже в благоприятных условиях (Haldane, 1941; Medawar, 1952; Williams, 1957; Hamilton, 1966).

Еще одним проверяемым следствием классической теории старения (а именно, гипотезы Уильямса) является сопряженность эволюционных изменений ПЖ и возрастной динамики плодовитости. Уильямс отмечал, что успешный отбор на долголетие должен приводить к снижению жизненной активности в молодости (Williams, 1957). Чем короче жизнь, тем выше должна быть плодовитость на ранних стадиях жизненного цикла по сравнению с поздними, и наоборот, чем длиннее жизнь, тем заметнее сдвиг репродукции на поздние сроки.

5. Эволюционные эксперименты по изучению продолжительности жизни

Одним из классических подходов к изучению эволюционно-генетических основ ПЖ и других параметров жизненного цикла являются эксперименты по искусственному отбору. В таких экспериментах были получены результаты, согласующиеся с гипотезой Уильямса и проверяемыми следствиями из нее (Wattiaux, 1968; Rose, Charlesworth, 1981).

Так, Роуз (Rose, 1984a) сравнил ПЖ и возрастную динамику плодовитости у лабораторных линий *D. melanogaster*, которые в течение 180 поколений (около 7 лет) существовали в режиме короткого жизненного цикла (размножение в возрасте двух недель от стадии яйца), и произведенных от них линий, которые в течение двух лет подвергались отбору на позднее размножение (возраст имаго, допущенных к репродукции, постепенно увеличивали от 28 до 70 сут). Роуз показал, что в результате отбора на позднее размножение ПЖ дрозофил значительно увеличилась, а максимум плодовитости сдвинулся на более поздний срок. В другом подобном эксперименте отбор на позднее размножение привел к еще более впечатляющим результатам, увеличив среднюю ПЖ с 35 до 70 сут за 21 поколение (Luckinbill, Clare, 1985). У Партриджа (Partridge) и соавторов отбор на позднюю репродукцию привел к увеличению ПЖ, снижению ранней плодовитости, однако в позднем возрасте плодовитость не повысилась (Partridge et al., 1999).

Если, напротив, вести отбор на раннее размножение (или повышенную частоту спариваний в раннем возрасте), то это ведет к смещению репродуктивного усилия на более молодой возраст и в ряде случаев к сокращению ПЖ (стратегия «живи быстро, умри молодым») (Rose, Charlesworth, 1981; Luckinbill et al., 1984; Mueller, 1987; Partridge, Fowler, 1992; Travers et al., 2015). В тщательно выполненном эволюционном эксперименте было показано, что высокая смертность, вызванная внешними причинами и не зависящая от возраста (регулярная безвыборочная элиминация экспериментатором части особей в подопытных линиях), приводит к такому же результату: наследуемому сокращению ПЖ и сдвигу размножения на ранний возраст (Stearns et al., 2000). Тем

самым подтвердилось предположение о том, что эволюционным ответом на высокую «внешнюю» (экзогенную) смертность может стать ускоренное старение (рост «внутренней» (эндогенной) смертности с возрастом). Сходство эволюционных последствий высокой смертности, вызванной внешними причинами, и отбора на раннее размножение, по-видимому, объясняется тем, что высокая смертность, не зависящая от возраста, автоматически приводит к отбору на раннее размножение: в условиях, когда шансы на долгую жизнь невелики, селективное преимущество получают особи, эффективно размножающиеся в раннем возрасте.

Обратное соотношение ПЖ и ранней плодовитости согласуется с идеей об «эволюционном компромиссе», то есть перераспределении ограниченных физиологических ресурсов между функциями репродукции и поддержания жизнеспособности в ответ на критические требования среды. Результатом такого компромисса как раз и должна быть постулированная Уильямсом антагонистическая плеiotропия: аллели, повышающие раннюю плодовитость, с большой вероятностью будут снижать жизнеспособность в позднем возрасте, и наоборот (Williams, 1957; Kirkwood, 1977; Kirkwood, Rose, M.R. 1991; Partridge et al., 1999; Sgrò, Partridge, 1999).

Результаты ряда эволюционных экспериментов значительно укрепили позиции сторонников гипотезы Уильямса и выросших из нее «классических» эволюционных моделей старения, включающих идеи об антагонистической плеiotропии и накоплении вредных мутаций с поздним эффектом. Однако другие исследования показали, что влияние экзогенной смертности на эволюцию ПЖ далеко не всегда согласуется с гипотезой Уильямса (Abrams, 1993; Reznick et al., 2004; Williams et al., 2006; Chen, Maklakov, 2012). Оказалось, что рост внешней смертности иногда сопровождается не снижением, а увеличением ПЖ. Например, в популяциях гуппи, где высок пресс хищников, размножение смещается на более ранние сроки, что согласуется с гипотезой Уильямса, однако генетически обусловленная ПЖ при этом не только не уменьшается, но даже увеличивается

(Reznick et al., 1997; Reznick et al., 2004). В эволюционном эксперименте на нематодах *Caenorhabditis remanei* было показано, что случайная неизбирательная элиминация, в соответствии с гипотезой Уильямса, приводит к сокращению ПЖ. Однако столь же интенсивная элиминация, вызываемая направленным действием определенного фактора среды (повышением температуры), приводит, напротив, к росту ПЖ, который к тому же не сопровождается снижением плодовитости (Chen, Maklakov, 2012). По всей вероятности, это означает, что отбор на устойчивость к фактору, вызывающему повышенную смертность, может повышать общую устойчивость организма, замедляя старение (Williams, Day, 2003). Если смертность, вызываемая внешним фактором, избирательна (зависит от состояния организма), а различия между особями по способности противостоять этому фактору хотя бы отчасти наследственны, то эволюционным ответом на высокую внешнюю смертность будет рост устойчивости к данному фактору, что может в итоге привести к росту ПЖ, а не к ее уменьшению. С этой точки зрения обратную ситуацию, когда рост внешней смертности ведет к сокращению ПЖ в соответствии с гипотезой Уильямса, можно интерпретировать как «эволюционную капитуляцию», вызванную неспособностью популяции противостоять фактору, вызывающему повышенную смертность.

Простые и логичные гипотезы о снижении давления отбора на поздних этапах жизненного цикла и о неизбежном перераспределении физиологических ресурсов в дальнейшем были существенно уточнены и дополнены на базе экспериментального материала, в частности, по *D. melanogaster*. Оказалось важным при интерпретации изменений ПЖ и плодовитости учитывать условия и длительность содержания лабораторных линий. У линий, существующих в разных режимах отбора, соотношения ПЖ и репродуктивных показателей различаются. Но это может быть результатом не только отбора, но и потери генетического разнообразия в ходе длительного лабораторного содержания (Giesel et al., 1982; Rose, 1984b) и накопления вредных мутаций из-за дрейфа, особенно сильного в популяциях с низкой численностью. Линнен (Linnen) с коллегами (Linnen et al.,

2001), проводившие сравнение ПЖ в нескольких старых лабораторных линиях дрозофил, показали, что сопряженные изменения ПЖ и плодовитости могут отчасти быть результатом накопления вредных мутаций в долго существующих лабораторных линиях. Эволюционные закономерности, характерные для природных популяций, могут быть замаскированы проявлениями описанных мутаций, которые вряд ли закрепились бы в больших естественных популяциях. В популяциях, содержащихся в лаборатории 20 и более лет, может быть потеряна выявленная связь между долголетием и устойчивостью к стрессу (Phelan et al., 2003; Archer et al., 2003). Бёрк и Роуз (Burke, Rose, 2009) в своем обзоре, посвященном эволюционным экспериментам на дрозофилах, называют такие ситуации демонами, убивающими эволюционные эксперименты.

В настоящем исследовании мы анализируем результаты эволюционного эксперимента по адаптации лабораторных линий *D. melanogaster*, недавно произведенных от природной популяции, к неблагоприятному корму (Марков и др., 2015, 2016). Линии дрозофил аутбредны и с высокой вероятностью сохранили генетическое разнообразие, характерное для диких популяций, поэтому отбор в различных условиях среды или по определенным признакам будет эффективным. В поддержку этого свидетельствуют результаты исследования Хоскинза с соавторами (Hoskins et al., 2001), в котором показано, что даже в таких лабораторных линиях *D. melanogaster* как Canton S, Oregon R, w^{iso2};iso3 и т. д., которые десятки лет содержатся в лаборатории, сохраняется высокий уровень однонуклеотидных полиморфизмов.

6. Адаптация дрозофил к стрессовым условиям среды

D. melanogaster как эврибионтный вид и как удобный модельный организм широко применяется в лаборатории для изучения выработки адаптаций (изменения эффективности размножения) к различным стрессовым условиям, например, таким как температурные колебания (Bubliy, Loeschke, 2005; Hoffmann, Willi, 2005; Tobler et al., 2015), ядовитые вещества (Shirley, Sibly, 1999; Kliot, Ghanim, 2012)

патогены и паразиты (Fellowes et al., 1998; Vijendravarma et al., 2009), и т. д.

Адаптация дрозофил к соленому корму – удобная и часто используемая в эволюционных экспериментах модельная система (Waddington, 1959; Te Velde et al., 1988; Stergiopoulos et al., 2009; Zhang et al., 2011; Long et al., 2013; Arbuthnott, Rundle, 2014; Дмитриева и др., 2016; Yakovleva et al., 2024). Для дрозофил концентрация NaCl в корме, превышающая 2–3%, является негативным фактором, замедляющим развитие и повышающим смертность (Te Velde et al., 1988; Stergiopoulos et al., 2009). Однако в ряде эволюционных экспериментов, начало которым положил еще Конрад Уоддингтон в середине прошлого века (Waddington, 1959), было показано, что дрозофилы способны за несколько десятков поколений адаптироваться к концентрациям соли до 6-8% (Te Velde et al., 1988; Zhang et al., 2011; Long et al., 2013; Arbuthnott, Rundle, 2014; Дмитриева и др., 2016). Причем в работе Жанга и соавторов выявлены генетические изменения на 2 и 3 хромосомах у адаптированной популяции по сравнению с предковой (Zhang et al., 2011).

Ранее в долгосрочном эволюционном эксперименте кафедры биологической эволюции МГУ было показано, что адаптация к высокой концентрации соли может приводить к росту эффективности размножения не только на соленом корме, но и на контрольном корме, то есть приводить к генерализации и расширению трофической ниши (Дмитриева и др., 2016). Выяснению того, отражается ли приобретение адаптации к данному виду стрессового корма на других параметрах жизненного цикла (кроме эффективности размножения), одна из задач настоящего исследования.

Традиционно считалось, что наблюдаемая в таких экспериментах адаптация является результатом изменений генофонда лабораторной популяции макроорганизмов. Однако Дмитриевой и коллегами было показано, что в адаптацию дрозофил к соленому корму вносит важный вклад симбиотическая микробиота, в том числе ее дрожжевой компонент (Панченко и др., 2017; Dmitrieva et al., 2019). О чем подробнее будет сказано в параграфе 9 настоящего раздела, посвященной роли микробиоты в эволюции параметров жизненного цикла

дрозофил. Уточнить вклад микробиологического фактора в эволюцию продолжительности жизни – еще одна из задач настоящей работы.

Второй стрессовый корм, к которому адаптировались дрозофилы в настоящем исследовании, также имеет свою предысторию. Мухи *D. melanogaster* и *D. pseudoobscura* адаптировались к корму на основе крахмала в исследованиях Додд, Шарона и Найярро (Dodd, 1989; Sharon et al., 2010; Najarro et al., 2015). Было показано, что дрозофилы адаптируются к неблагоприятному корму, приобретают индивидуальную микробиоту, которая даже сказывается на последующей избирательности полового партнера, однако изменяется ли ПЖ и плодовитость дрозофил на данном корме, ранее не изучалось и стало одной из задач настоящего исследования.

7. Влияние гетерогенной среды на ход адаптации к стрессовым условиям и изменение параметров жизненного цикла

В ряде описанных выше экспериментов было показано, что адаптация к стрессовым условиям модулирует условия избирательной или неизбирательной смертности, и сложившиеся условия отбора могут влиять на параметры жизненного цикла, причем направленность эволюционных изменений во многих случаях (хотя и не всегда) соответствует предсказаниям классической эволюционной теории старения. Это подтвердилось и в экспериментах по адаптации дрозофил к соленому и крахмальному кормам, проведенных в рамках настоящего исследования. Следующий вопрос, который закономерно возникает – как те или иные дополнительные факторы могут влиять на установленные закономерности. К примеру, имеет ли значение, является ли среда обитания однородной или гетерогенной?

Пространственная и временная неоднородность среды обитания считается одним из важных факторов, влияющих на скорость, направленность и эффективность адаптивной эволюции, а также на динамику генетического

разнообразия популяций и таксономического разнообразия сообществ (Futuyma, Moreno, 1988; Kassen, 2002).

Предполагается, что гомогенная среда, обеспечивая постоянный однонаправленный отбор, способствует экологической специализации и выработке эффективных, но односторонних адаптаций (Lynch, Gabriel, 1987). Важную роль в этом могут играть эволюционные компромиссы (trade-offs) и антагонистическая плейотропия, которая ведет к тому, что рост приспособленности к одним факторам среды часто достигается ценой снижения приспособленности к другим. Это способствует ускоренной утрате функций, по отношению к которым отбор ослаблен (Ostrowski et al., 2007; Legros, Koella, 2010; Remold, 2012). Экспериментальное подтверждение того, что антагонистическая плейотропия может вносить важный вклад в экологическую специализацию (сужение потенциальной ниши) в ходе адаптации к гомогенной среде, получено в долгосрочном эволюционном эксперименте на *Escherichia coli* (Cooper, Lenski, 2000; Good et al., 2017). Впрочем, снижение приспособленности к условиям, с которыми особи не встречаются или встречаются редко, может происходить и просто за счет мутационной деградации неиспользуемых функций без участия антагонистической плейотропии (Reboud, Bell, 1997).

В гетерогенной среде эволюция может пойти разными путями. С одной стороны, возможна дивергенция с последующей экологической специализацией форм, адаптированных к разным условиям или нишам в пределах одного и того же биотопа. Это может в итоге привести к симпатрическому (экологическому) видообразованию (Креславский, 1994; Rundle, Nosil, 2005; Good et al., 2017). Предполагается, что в этом сценарии «стоимость» адаптации (отрицательные корреляции между приспособленностью к разным наборам условий, плейотропия, эволюционные компромиссы) тоже играют важную роль, способствуя диверсификации и обеспечивая возможность сосуществования филогенетически и морфологически близких, но экологически различающихся видов в одном сообществе (Levene, 1953; Kneitel, Chase, 2004). Гетерогенная среда может также

способствовать росту и поддержанию внутрипопуляционного генетического и фенотипического разнообразия (Kassen, 2002; Legros, Koella, 2010; Long et al., 2013).

С другой стороны, если «стоимость» адаптации к тем или иным условиям невысока (то есть адаптация может быть достигнута без существенного снижения приспособленности к другим условиям), то гетерогенная среда может способствовать генерализации – выработке комплексных адаптаций, позволяющих успешно выживать и размножаться в разнообразных обстановках. Можно ожидать, что аллели, одновременно повышающие приспособленность к двум или нескольким наборам условий, характерным для разных локаций в пределах биотопа, будут быстро распространяться. В то же время аллели, повышающие приспособленность только к одной комбинации условий ценой ее снижения в других (не менее актуальных) обстановках, будут поддерживаться отбором слабее, чем в гомогенной среде. В условиях свободного перемещения между участками с разными условиями среди особей, успешно размножающихся в данных условиях, могут обнаруживаться как генералисты с адаптациями широкого профиля, так и специалисты, адаптированные только к таким условиям (Levene, 1953; Via, Lande, 1985, 1987; Gillespie, Turelli, 1989).

Таким образом, гетерогенность среды, по-видимому, может приводить к разным эволюционным последствиям. До сих пор, однако, данная проблема рассматривалась лишь в немногих работах по экспериментальной эволюции (обзоры: Kassen, 2002; Kawecki et al., 2012).

Так, влияние пространственной и временной гетерогенности среды на адаптацию изучалось в серии экспериментов на бесполой популяции жгутиконосцев *Chlamydomonas* (Bell, Reboud, 1997; Reboud, Bell, 1997; Kassen, Bell, 1998). Популяции содержались либо в стабильных условиях (на свету или в темноте), либо в условиях освещенности, варьирующей в пространстве или времени. В гомогенной среде произошла экологическая специализация: жгутиконосцы, адаптированные к темноте, хуже росли на свету, и наоборот.

Снижение приспособленности к альтернативным условиям в гомогенной среде, по-видимому, было связано в большей степени со свободным накоплением мутаций, нарушающих неактуальные функции, чем с «компромиссами» и антагонистической плейотропией, поскольку оказалось возможным вывести линии генералистов, почти столь же эффективных в каждой из двух сред, как и специалисты. Пространственная гетерогенность среды также способствовала специализации особей, что проявилось в поддержании высокого уровня генетического разнообразия, то есть в сосуществовании клонов, адаптированных к высокой и низкой освещенности (Reboud, Bell, 1997). Напротив, временная гетерогенность способствовала эволюции генералистов – универсалов, одинаково успешно развивающихся в темноте и на свету (Kassen, Bell, 1998). Эти и некоторые другие (Barrett et al., 2005) эксперименты проводились на бесполом популяциях, поэтому приложимость полученных выводов к организмам, размножающимся половым путем, неочевидна.

В ряде других исследований было показано, что гетерогенная среда может способствовать эволюции генералистов, не уступающих специалистам или даже превосходящих их по приспособленности к каждому отдельному набору условий (Weaver et al., 1999; Hughes et al., 2007; Legros, Koella, 2010; Duncan et al., 2011; Ketola et al., 2013; Condon et al., 2014). Например, в эволюционном эксперименте на *D. melanogaster* временная (но не пространственная) гетерогенность температурных условий (мухи по 4 недели жили то при 16, то при 25°C) способствовала росту плодовитости мух как в тепле, так и в холоде, по сравнению с линиями, содержащимися при постоянной высокой либо низкой температуре (Condon et al., 2014). В другом эксперименте временная гетерогенность условий (чередующееся размножение в разных типах клеток) способствовала эволюции эффективных генералистов среди арбовирусов (Weaver et al., 1999). Аналогичные результаты, свидетельствующие о том, что «стоимость» генерализации может быть невысокой (Remold, 2012), были получены в экспериментах по культивированию бактерии *Escherichia coli* при переменном и постоянном pH (Hughes et al., 2007), а

также в опытах по выращиванию инфузории *Paramecium caudatum* и бактерии *Serratia marcescens* при переменной и постоянной температурах (Duncan et al., 2011; Ketola et al., 2013).

Таким образом, на сегодняшний день имеются достаточно убедительные экспериментальные данные о том, что стабильная гомогенная среда нередко способствует специализации, а временная гетерогенность среды (изменчивость условий во времени) – генерализации. При этом эффекты пространственной гетерогенности условий (то есть одновременной доступности локаций с различающимися условиями) остаются слабо изученными. В тех немногочисленных эволюционных экспериментах, в которых имитировалась такая гетерогенность, она либо способствовала генетической дифференциации и специализации особей, что вело к росту генетического разнообразия популяции (Reboud, Bell, 1997), либо не давала значимых эффектов (Condon et al., 2014); а в найденных исследованиях по пространственной гетерогенности у дрозофил либо не было возможности самостоятельного выбора между средами (Huang et al., 2015; Wang et al., 2019), либо эффект гетерогенности нельзя отличить от эффекта приспособления к определенным стрессовым условиям как таковым (Wang et al., 2019; Joshi, Thompson, 1997). По-видимому, на данный момент нет прямых и однозначных экспериментальных подтверждений того, что пространственная гетерогенность, как и временная, может способствовать эволюции эффективных генералистов. Задача настоящего исследования – прояснить данный вопрос с помощью эволюционного эксперимента на дрозофилах.

8. Факторы, помимо генетических, влияющие на результаты отбора

Результаты экспериментов по искусственному отбору традиционно интерпретируются в классическом эволюционном духе как следствие изменений в генофонде подопытных организмов. Однако есть и другая точка зрения, согласно которой следует проявлять большую осторожность при интерпретации наблюдаемых результатов искусственного отбора и не приписывать их «по

умолчанию» изменениям генофонда подопытных линий, поскольку другие факторы также могут влиять на них (Arora et al., 2020; Baret et al., 1996). Результаты, полученные в наших экспериментах, заставляют прислушаться к этому мнению.

Факторы, влияющие на параметры жизненного цикла дрозофил, многообразны. В ходе эволюционных экспериментов на параметры жизненного цикла могут влиять, помимо генетических изменений, различные абиотические, трофические и социальные факторы, а также состав и структура ассоциированной микробиоты. Рассмотрим их более внимательно.

Внешние абиотические и трофические факторы: температура, световой режим, влажность, диета. ПЖ мух может значительно варьировать под влиянием абиотических факторов среды. Так, показано, что ПЖ дрозофил сокращается при увеличении температуры (Miquel et al., 1976; Бычковская и др., 2017). Также выявлено, что ПЖ сокращается при увеличении светового дня, что может быть связано с продлением ежесуточного периода активности (Москалев и др., 2006). В настоящем исследовании мы стремились исключить влияние данных факторов на результаты тестов благодаря тому, что сопоставлялись только варианты тестов, проводившихся одновременно.

Социальные факторы: связанные с плотностью популяции (например, с плотностью личинок в кормовом субстрате), а также с индивидуальными взаимодействиями между особями (прежде всего это относится к половому поведению). Показано, что высокая плотность личинок ведет к росту средней ПЖ у имаго *D. melanogaster*, причем этот эффект может проявляться и как модификационная изменчивость в пределах нормы реакции (фенотипическая пластичность), и как устойчивый эволюционный результат адаптации к развитию в условиях высокой плотности личинок (Shenoi et al., 2016). Другие исследования показывают, что при повышенной плотности личинок происходит увеличение ПЖ мух, вышедших из куколок на 8–9 сутки после откладки яиц, в сравнении с контрольной группой, чьи личинки развивались при нормальной плотности (примерно 4 яйца на квадратный сантиметр) (Miller, Thomas, 1958). У мух,

вышедших из куколок позднее, не наблюдается значимых различий по ПЖ в сравнении с контрольной группой (Вайсерман и др., 2017).

Конфликт полов, проявляющийся в различных стратегиях полового поведения, также может влиять на ПЖ, как напрямую через социальное взаимодействие особей, так и косвенно, за счёт генов, ассоциированных как со старением, так и с половым поведением. Например, показано, что агрессивные ухаживания и конкуренция между самцами негативно сказываются на ПЖ самок и способствуют их ускоренному репродуктивному старению (Carazo et al., 2014). В репродуктивной борьбе между самцами, проявляющейся в уничтожении или удалении чужих сперматозоидов, принимают участие продукты клеток придаточной железы (accessory gland). Показано негативное воздействие этих продуктов на самок и сокращение их ПЖ при повышенной частоте спариваний (Fowler, Partridge, 1989; Chapman et al., 1995; Sirot et al., 2011; Billeter et al., 2018; Verma et al., 2024). Самки генетически различаются по устойчивости к этому негативному воздействию со стороны самцов, а самцы, в свою очередь, генетически различаются по силе этого воздействия (Friberg, 2005).

Факторы, связанные с микробиотой, рассмотрены в следующих параграфах в контексте хологеномной эволюционной теории.

9. Хологеномная теория эволюции

Симбиоз многоклеточных и одноклеточных организмов – факт давно известный, но его важность в эволюционном контексте была осознана сравнительно недавно. О симбионтах, передаваемых по наследству (hereditary symbiosis), как о важном факторе видообразования и появления эволюционных новшеств (наряду с наследуемыми мутациями) высказались Линн Маргулис и Рене Фестер в книге «Симбиоз как источник эволюционных инноваций: видообразование и морфогенез» («Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis») (Margulis, Fester, 1991). В настоящее время этот спектр идей носит название «хологеномной теории эволюции» (hologenome theory

of evolution) (Zilber-Rosenberg, Rosenberg, 2008; Rosenberg et al., 2009; Bordenstein, Theis, 2015; Simon et al., 2019). Согласно поисковой системе PubMed, данный термин впервые упоминается в работе 2007 г., посвященной роли микроорганизмов в приспособленности кораллов (Rosenberg et al., 2007). На кораллах было показано, что микробиота может участвовать в быстром реагировании на изменения окружающей среды, и эта способность микробиоты гибко подстраиваться под новые температурные условия позволяет организму хозяина эффективно адаптироваться к ним (Voolstra et al., 2020).

Главная идея теории состоит в том, что в качестве единицы отбора необходимо рассматривать хологеном – макроорганизм и ассоциированную с ним микробиоту, так как эволюционные изменения макроорганизмов могут быть связаны не только с изменением генофонда популяции, но и с изменениями состава и структуры микробиома или с изменениями в геномах симбионтов, которые позволяют хозяину адаптироваться к изменяющимся условиям (Currie et al., 2006; Anbutsu et al., 2017).

Выделяют четыре главных принципа, на которых она строится:

1. Все животные и растения создают симбиотические связи с микроорганизмами;
2. Симбиотические микроорганизмы могут передаваться в череде поколений;
3. Связь между макроорганизмом-хозяином и микроорганизмом-симбионтом влияет на приспособленность всего холобионта к его среде обитания;
4. Изменчивость холобионта может достигаться изменениями не только генома организма-хозяина, но и изменениями совокупного генома его микробиома, причем видовой состав микробиома может значительно и быстро меняться в условиях стресса (Zilber-Rosenberg, Rosenberg, 2008).

Концепция хологеномной теории эволюции также может рассматриваться как часть теории коэволюции (Currie et al., 2006; Anbutsu et al., 2017), хотя в литературе довольно редко два эти фундаментальных понятия встречаются вместе.

Козволюционный смысл хологеномной теории состоит в том, что два организма в процессе совместной жизни, а следовательно, совместной эволюции, становятся все более и более зависимыми друг от друга, а в предельном случае один из симбионтов может стать органеллой другого, как, например, случилось с альфапротеобактерией, ставшей в последствии митохондрией (Sagan, 1967).

В настоящее время уделяется большое внимание изучению роли симбиотической микробиоты в онтогенезе и эволюции многоклеточных организмов (McFall-Ngai, 2002; Rosenberg et al., 2007; Douglas, 2018). Однако пока данный фактор не рассматривается как весомый при изучении эволюции отдельных признаков организма, а в исследованиях по искусственному отбору микробиота подопытных организмов не контролируется.

10. Влияние микробиоты на параметры жизненного цикла дрозофил

В параграфе 2 настоящего раздела мы уже обсудили, что с дрозофилой неразрывно связана ее ассоциированная дрожжевая и бактериальная микробиота, которая влияет на все ключевые аспекты жизни организма хозяина, в том числе и на его параметры жизненного цикла.

В основной работы, изучающие разные аспекты влияния микробиоты на ПЖ дрозофил, сфокусированы на ее бактериальной составляющей; причем рассматривается не только вся бактериальная микробиота, но отдельные ее компоненты (Clark et al., 2015; Gould et al., 2018; Maynard, Weinkove, 2018; Lee et al., 2019, 2022; Matthews et al., 2020, 2021; Arias-Rojas, Iatsenko, 2022).

Можно уверенно говорить о пользе, которую многие бактерии, встречающиеся в кишечнике и на кутикуле дрозофил, приносят макроорганизму. Однако подобный эффект нельзя назвать «бесплатным». Показано, что бактерии снижают ПЖ мух за счет гиперактивации врожденного иммунного ответа по Imd пути, нарушения функции и структуры кишечника (Fast et al., 2018; Yamashita et al., 2021; Lee et al., 2022). Некоторые признаки старения, такие как накопление аллантаина и снижение активности генов ответа на стресс, оказываются частично

обусловлены бактериями (Yamauchi et al., 2020; Shukla et al., 2021). Негативное влияние на ПЖ мух оказывает бактериальная нагрузка. Чем больше обилие бактерий в организме хозяина, тем сильнее растёт его ПЖ при добавлении в пищу антибиотиков (Lee et al., 2019).

Ещё в 1927 г. Штейнфельд установил, что дрозофилы, пищеварительный тракт которых лишен микробиоты, живут дольше, чем контрольные мухи (цит. по Gould et al., 2018). В ряде работ показано, что изменения в составе микробиоты (в том числе увеличение доли гаммапротеобактерий с возрастом) вызывают дисбактериоз и дисфункцию кишечного барьера у старых мух, приводя к гибели (Clark et al., 2015; Lee et al., 2022).

В исследовании Гулда и коллег (Gould et al., 2018) были оценены ПЖ, плодовитость и время развития мух, лишенных кишечной микробиоты, и тех же мух, живущих на корме, засеянном одним из пяти главных компонент их бактериальной кишечной микробиоты или всеми их комбинациями (от двух до пяти компонентов). Выяснилось, что мухи, лишенные бактериальной микробиоты живут значимо дольше, чем мухи, содержащиеся на корме, засеянном отдельными видами бактерий или любыми их комбинациями. Однако плодовитость (оцениваемая в единицу времени) самок с более низкой ПЖ выше, чем у долгожительниц, причем это не связано с разной двигательной активностью дрозофил. Данный результат согласуется с идеей об «эволюционном компромиссе» (trade-off) между размножением и долголетием. Гулд и коллеги определили приспособленность как функцию времени развития, ПЖ и плодовитости, определяющую скорость роста численности популяции, и показали, что она одинакова для короткоживущих и долгоживущих мух. Иными словами, в зависимости от состава микробиоты мухи перераспределяют ресурсы между ПЖ и плодовитостью, на практике подтверждая эволюционную гипотезу «одноразовой сомы». Вальтерс показал, что та же закономерность наблюдается и у диких мух (Walters et al., 2020).

Один и тот же вид бактерий может как повышать, так и сокращать ПЖ мух,

что показала Анжела Дуглас в своём обзоре влияния *Lactobacillus plantarum* на дрозофил (Douglas, 2018). Бактерия *L. plantarum* в некоторых работах ведёт себя как полезный пробиотик, тогда как в других приводит к нарушению кишечного эпителия и сокращению ПЖ. Такое различие автор объясняет влиянием возраста мух, отличиями в генотипах линий дрозофил, разными штаммами *L. plantarum* и различиями в лабораторном корме. Данный пример показывает, почему результаты исследований, полученных в разных лабораториях, могут быть не полностью сопоставимы.

Дрожжи являются важным, если не основным, источником питания дрозофил как на личиночной, так и на имагинальной стадиях жизненного цикла (Cooper, 1960; Begon, 1982; Anagnostou et al., 2010; Mure et al., 2023), тем не менее влияние дрожжевой микробиоты на параметры жизненного цикла дрозофил изучено слабо. Еще меньше изучено влияние отдельных видов дрожжей. Так, в обширном обзоре Арьяса-Рохаса и Яценко (Arias-Rojas, Iatsenko, 2022), посвященном влиянию микробиоты на старение *D. melanogaster*, только две из 121 процитированной работы затрагивают дрожжевой компонент микробиоты (Yamada et al., 2015; Keebaugh et al., 2019). В связи с этим в настоящем исследовании основное особое внимание уделено дрожжевой составляющей и отдельным ее компонентам.

В эксперименте Чиппиндейл с коллегами (Chippindale et al., 1993) варьировали объем доступных для мух живых пекарских дрожжей в корме. Эксперимент показал увеличение средней ПЖ мух в линиях, тестируемых на корме, засеянном наименьшим количеством живых дрожжей, но влияние конкретных видов дрожжей не изучалось.

В исследовании Анагносту и др. (Anagnostou et al., 2010) изучается влияние дрожжей видов *Kluyveromyces lactis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Peterozyma toletana* (бывш. *Pichia toletana*) и *Saccharomyces cerevisiae* на выживаемость и время развития преимагинальных стадий, массу тела мух, но не на продолжительность жизни взрослых особей. Кроме того, использованные в исследовании штаммы дрожжей не были выделены из мух, на которых проводилось тестирование. Тогда

как в работе Хоанга и соавторов показано, что изучение взаимодействия мух и выделенных из них штаммов дрожжей дает больше данных для понимания взаимодействия хозяина и его микробиоты (Hoang et al., 2015).

Дрожжи по-разному влияют на ПЖ мух в зависимости от питательности среды, на которой содержатся дрозофилы. В работах Ямада и Киба (Yamada et al., 2015; Keebaugh et al., 2019) протестировано влияние дрожжей *Issatchenkia orientalis* (синоним *Pichia kudriavzevii*), выделенных из мух, на их ПЖ. В качестве контроля были использованы дрожжи *S. cerevisiae*. Авторы выявили, что дрожжи *I. orientalis* продлевают мухам жизнь на обедненной диете и сокращают ее на стандартной. Пекарские дрожжи *S. cerevisiae* редко встречаются у дрозофил как в природе, так и в лабораторных линиях (Hoang et al., 2015). Возможно, поэтому их влияние на ПЖ может быть выражено слабо (Keebaugh et al., 2019).

Однако в другой работе показано, что присутствие живых дрожжей *S. cerevisiae* в корме влияет на размер и плодовитость дрозофил, значительно увеличивает скорость их развития, но, очевидно, сокращает их жизнь (Lewis, Hamby, 2019; Murgier et al., 2019). Среди механизмов сокращения ПЖ, возможно, стоит рассматривать влияние белков с амилоидными свойствами, входящими в состав клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae*, которые могут быть индукторами развития системных амилоидозов (Рекстина и др., 2016; Калебина и др., 2021). Некоторые из веществ-промоуторов амилоидозов, поступая с кормом, могут на начальном этапе заметно увеличивать двигательную активность мух, но впоследствии сокращают их активность и ПЖ (Pokrzywa et al., 2017).

В работе Ли и др. (Li et al., 2023) авторы изучали влияние более 1000 гомозиготных диплоидных штаммов *S. cerevisiae* с нокаутом одного гена (из коллекции yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene-knockout collection, YKOC) на ПЖ, сон и двигательную активность мух *D. melanogaster*. Выяснилось, что 17% мутантных штаммов дрожжей меняют ПЖ дрозофил больше, чем на 10%, в сравнении с контрольными *S. cerevisiae*. И изменения ПЖ были не только в сторону уменьшения, но и в сторону увеличения. Мутации в тех штаммах *S. cerevisiae*,

которые влияли на ПЖ и активность дрозофил, были связаны с генами метаболизма жирных кислот, аминокислот, витамина B6 и т. п., то есть дрожжи влияют на сон и ПЖ своих хозяев в процессе их обеспечения питательными веществами.

Маир с коллегами (Mair et al., 2005) провели тест, в котором снизили потребление мухами мертвых дрожжей и сахара и показали, что у мух, потребляющих меньше дрожжей, ПЖ увеличилась гораздо сильнее, чем у мух, получающих меньше сахара. Причем отмечено, что мухи не компенсировали снижение содержания питательных веществ в корме увеличением времени, которое они тратили на кормление. Иными словами, не количество калорий, а именно качественный состав пищи влияет на ПЖ (Min, Tatar, 2006).

Данный результат уточнил Грандизон (Grandison) с коллегами, показав, что дефицит метионина в корме сокращает плодовитость, а соотношение метионина и других незаменимых аминокислот влияет на ПЖ. Жизнь сокращается только в том случае, если дрозофилы получают «стандартное» количество метионина и других незаменимых кислот одновременно (как в стандартном лабораторном корме), все остальные комбинации метионина и аминокислот обеспечивают долгую жизнь (Grandison et al., 2009). По-видимому, именно с этим фактом связано то, что не во всех тестах с ограниченной диетой удастся продлить жизнь модельным организмам (Mattison et al., 2012; Taormina, Mirisola, 2014). Даксбери и Чапман (Duxbury, Chapman) варьировали содержание дрожжей в корме на личиночной и взрослой стадиях жизни дрозофил и выяснили, что содержание дрожжей в корме может оказывать противоположное влияние на ПЖ, плодовитость и частоту спариваний самок и самцов дрозофил (явное наличие полового диморфизма по изученным параметрам жизненного цикла) (Duxbury, Chapman, 2019). Однако к результатам упомянутых эксперимента в контексте настоящей работы стоит относиться аккуратно, ведь основная задача изучить влияние живой дрожжевой микробиоты, а не состава корма, на параметры жизненного цикла дрозофил, причем, скорее, нативной, чем привнесенной.

На дрозофилах из долгосрочного эволюционного эксперимента кафедры

биологической эволюции МГУ было показано, что адаптация (эффективность размножения) мух *D. melanogaster* к корму с высоким содержанием поваренной соли сопровождается изменением микробиоты, которую переносят взрослые мухи при заселении нового корма. Кроме того оказалось, что микробиота мух из данных линий увеличивает приспособленность (эффективность размножения) мух не только на соленом корме, но и на нормальном (контрольном) корме (Панченко и др., 2017). Был изучен видовой состав дрожжевой микробиоты из гомогенатов мух, адаптированных к соленому корму и из неадаптированных к соли мух (контрольных, нормальных). Выяснилось, что общее содержание дрожжей, полученных из мух с соленого корма существенно больше, чем у нормальных мух, а видовой состав дрожжей у мух с соленого и нормального корма различен. В гомогенатах мух из изучаемых линий выявлены два доминирующих вида дрожжей: *Pichia membranifaciens* и *Starmerella bacillaris*. Из них численность первого, по-видимому, не связана с концентрацией NaCl в корме и может варьировать в широких пределах. Напротив, численность *S. bacillaris* демонстрирует четкую связь с типом корма: этот вид дрожжей обилен в гомогенатах мух, адаптированных к соли, и либо отсутствует, либо имеет низкую численность в гомогенатах контрольных мух (Yakovleva et al., 2024). Таким образом, адаптация мух к соли сопровождается интенсивным развитием дрожжей *S. bacillaris* во всех повторностях эксперимента.

Можно предполагать, что показанная в эволюционных экспериментах (Waddington, 1959; Te Velde et al., 1988; Stergiopoulos et al., 2009; Long et al., 2013; Arbuthnott, Rundle, 2014; Дмитриева и др., 2016) быстрая адаптация *D. melanogaster* к повышенной концентрации соли во многом определяется изменениями симбиотической микробиоты, в том числе его дрожжевой составляющей. Вклад быстро эволюционирующих микробных сообществ в адаптацию дрозофил помогает объяснить, почему такая адаптация иногда происходит очень быстро и не всегда сопровождается негативными побочными эффектами (Ивницкий и др., 2018; Dmitrieva et al., 2019). Кроме того, полученный результат помогает объяснить

исключительно высокую экологическую пластичность и приспособляемость *D. melanogaster*, а также то, что этот вид не проявляет выраженной тенденции к разделению на множество дочерних видов, хотя он быстро вырабатывает локальные адаптации и даже зачаточные формы поведенческой репродуктивной изоляции, как в природе, так и в эволюционных экспериментах (Belkina et al., 2018).

Влияние дрожжей вида *S. bacillaris* на ПЖ и динамику плодовитость будет протестировано в настоящем исследовании.

Ранее считалось, что кишечная микробиота дрозофил является в основном транзитной, то есть поступает в кишечник с пищей, а ее развитие в самом кишечнике минимально (Blum et al., 2013). Однако позднее появились работы, свидетельствующие о более сложном и специфичном взаимодействии некоторых бактерий с желудочно-кишечным трактом дрозофил, что способствует формированию стабильной кишечной микробиоты, как минимум бактериальной (Obadia et al., 2017; Pais et al., 2018; Vandehoef et al., 2020). Известно, что дрожжи в сообществе влияют друг на друга (Liu et al., 2015) и мухи влияют на свое симбиотическое, как дрожжевое (Starmer et al., 1990; Stamps et al., 2012), так и бактериальное (Yakovleva et al., 2024) сообщество, поэтому можно полагать, что микробное сообщество дрозофил хотя бы отчасти неслучайно. Показано, что у различных видов дрозофил складываются устойчивые взаимоотношения с конкретными видами или группами видов дрожжей в зависимости от состава кормового субстрата или биогеографического распределения видов мух (Starmer et al., 1990).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Постановка долгосрочного эволюционного эксперимента

1.1. Исходная популяция *D. melanogaster*

Исходные популяции мух *Drosophila melanogaster* Meig. (Diptera, Drosophilidae), содержащиеся на кафедре биологической эволюции МГУ имени М.В. Ломоносова, произошли от 30 диких особей, пойманных на юго-западе Москвы осенью 2014 г. До января 2015 г. популяция содержалась на нормальном корме, а далее была разделена на популяции, культивируемые на нормальном, соленом и крахмальном кормах в гомогенных и пространственно гетерогенных условиях (см. ниже).

1.2. Корма, на которых культивировались мухи, используемые в исследовании

Исследуемые линии содержались на одном из четырех типов корма:

1) нормальный корм (далее обозначается буквой Н): стандартный лабораторный корм для дрозофил (60 г инактивированных дрожжей, 35 г манной крупы, 50 г сахара, 45 г измельченного изюма, 8 г агара, 2 г пропионовой кислоты на 1 л корма);

2) соленый корм (С): корм Н с добавлением поваренной соли. В разных повторностях эксперимента используются разные концентрации соли (уточняется в разделе «Материалы и методы» для каждого эксперимента);

3) крахмальный корм (К): корм с низким содержанием простых сахаров на основе крахмала (60 г инактивированных дрожжей, 30 г крахмала, 8 г агара, 2 г пропионовой кислоты на 1 л корма) (Горшкова и др., 2018);

4) Нистатиновый корм (Бд): корм Н с добавлением фунгистатического препарата нистатина в расчете 2 таблетки (500 000 Ед) на 1 литр корма.

1.3. Линии мух, используемые в исследовании и условия их содержания

В работе использовались следующие линии мух:

Мн – линия контрольных мух, основана в январе 2015 г., содержалась на благоприятном корме Н и не подвергалась отбор. Использовалось две реплики, численность каждой популяции высокая, исчислялась тысячами (Belkina et al., 2018; Sivunova et al., 2024);

Мк – линия, культивируемая на обедненном корме на основе крахмала К, основана в январе 2015 г. Крахмальный корм К является крайне неблагоприятным для *D. melanogaster*, что проявляется в высокой смертности и низкой ПЖ имаго (Яковлева и др., 2016). Линия Мк характеризуется низкой мгновенной численностью имаго, которая составляла около 100 особей (Belkina et al., 2018; Sivunova et al., 2024);

Мс – серия линий мух, содержащиеся на соленом корме С (использовалось несколько реплик, далее при описании тестирований будет указана концентрация NaCl в корме). Основана в январе 2015 г. Соленый корм в концентрации от 2–3% NaCl является стрессовым для мух, но во многих экспериментах показано, что дрозофилы быстро адаптируются к данному типу корма (см. параграф 4 «Обзора литературы»). Численность популяций соленых линий составляла несколько сотен особей (Belkina et al., 2018; Sivunova et al., 2024);

Мсс и Мкс – две линии, представляющие собой единую, частично подразделенную популяцию, содержащуюся в пространственно гетерогенной среде. Мухи содержатся в двойном боксе, в одном из отсеков которого находится корм С, а в другом – К. В стенке, разделяющей отсеки, имеется отверстие диаметром 3 мм, допускающее ограниченную миграцию мух между отсеками. Мсс – мухи из «соленого» отсека, Мкс – мухи из сообщающегося с ним «крахмального» отсека; вторая буква «с» в обозначениях линий означает условия «симпатрии». Основаны в январе 2015 г. Численность популяции высокая, исчислялась тысячами;

Мбд (от «без дрожжей») – линия мух, полученная в ноябре 2018 г. от мух из

линии Мн. Контрольные мухи были посажены на корм Мбд (Н с добавлением фунгистатического препарата нистатина), с целью получения мух, лишенных дрожжевой микробиоты (но в рецепте корма сохраняются термически обработанные дрожжи). Мухи культивировались в пробирках три месяца, до тех пор, пока в микробиологических посевах гомогенизированных мух не перестали высеваться живые дрожжи, далее культивируются в боксах (см. ниже). Численность популяции высокая, исчислялась тысячами;

Ма (от «aging») – линия мух, отбираемых на позднее размножение, получена в начале 2018 г. от мух из линии Мн в возрасте 83–85 дней (под «возрастом» здесь и далее понимается время с момента выхода мухи из куколки). Линия Ма представляет собой последовательно сменяющие друг друга когорты, то есть популяции мух примерно одного возраста, полученные от когорты предыдущего поколения в возрасте от 68 до 85 дней. Культивируется на корме Н. Численность когорты насчитывала от 154 до 724 особей.

Все используемые в данном исследовании линии содержались при комнатной температуре, 22–25°C, и естественном освещении в боксах из оргстекла, размером 160x200x200 мм. Линии Мсс и Мкс населяли два смежных бокса, соединенных отверстием диаметром 3 мм, допускающим ограниченную миграцию мух между отсеками, благодаря чему эти две линии составляют единую, частично подразделенную популяцию (Горшкова и др., 2018). Во всех линиях кроме Ма в боксе находилось 12 открытых цилиндрических стеклянных пробирок (диаметром 22 мм и высотой 100 мм), содержащих по 10 мл корма. Еженедельно в бокс помещалось четыре пробирки со свежим кормом и удалялось четыре пробирки, простоявшие в боксе три недели. В боксе с линией Ма корм подавался в трех чашках Петри диаметром 35 мм и заменялся на новый каждые три дня. Во все боксы помещалась поилка, представляющая собой пробирку, наполненную водой, и закрытую смоченной ватой. Поилка заменялась еженедельно (Яковлева и др., 2016; 2022; 2024).

Описанные выше линии мух, культивируемые в рамках эволюционного

эксперимента в боксах в условиях пересекающихся поколений, представляли собой аутбредные популяции. Однако многолетняя практика закрепила за ними именно термин «линии», а не «популяции», в связи с этим было принято решение сохранить привычный термин «линия» и использовать его в тексте.

2. Тесты для оценки изменений параметров жизненного цикла

D. melanogaster под влиянием различных факторов окружающей среды

В данных тестах оценивались различные параметры жизненного цикла дрозофил, характеризующие приспособленность мух к условиям среды: эффективность размножения (оценивалась по числу половозрелых потомков, произведенных одной или двумя парами родителей), продолжительность жизни (ПЖ), возрастная динамика смертности и возрастная динамика плодовитости (число откладываемых яиц в зависимости от возраста самки). Стандартная схема тестирования представлена на рисунке 1.

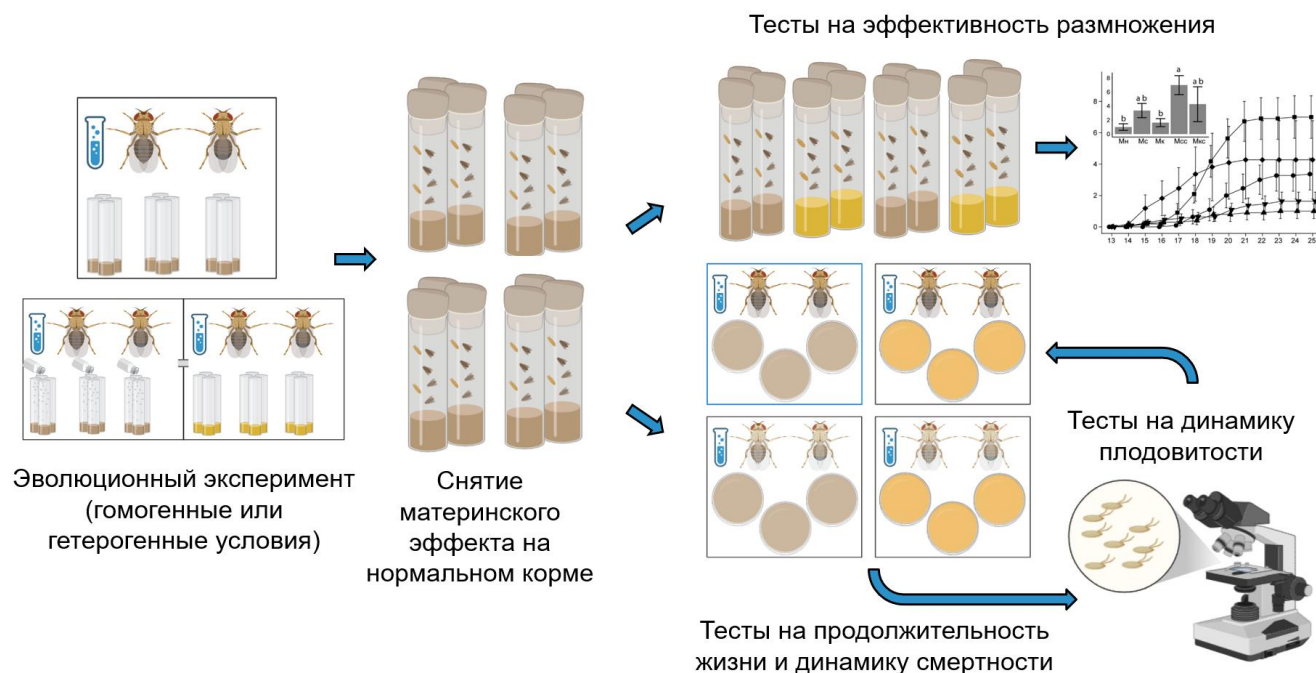


Рисунок 1. Схема тестирования, проводимых в настоящем исследовании.

2.1. Стандартный протокол тестирования мух для оценки ПЖ и возрастной динамики плодовитости самок

Одновременность тестирования. Параметры жизненного цикла мух (даже из одной и той же линии), протестированных в разные моменты времени, несопоставимы, так как на них воздействует множество неконтролируемых или лишь частично контролируемых факторов, таких как атмосферное давление, влажность, освещенность и т. д. В настоящем исследовании тестирования всех сопоставляемых линий проводилось строго одновременно. Данные, полученные в разных тестированиях (то есть проведенных не одновременно), количественно не сравнивались.

Снятие материнского эффекта. Мухи всех линий в течение одного поколения перед тестированием выращивались в одинаковых условиях: в стандартных пробирках с кормом Н, закрытых ватными пробками, при стандартной плотности 50–70 яиц (мух) на пробирку. Это делалось для снятия прямого влияния условий содержания и возможных материнских эффектов на параметры жизненного цикла (Mousseau et al., 2009; Марков и др., 2015). В каждом варианте теста использовалось от 8 до 12 пробирок для получения поколения мух со снятым материнским эффектом. Плотность яиц в пробирке контролировалась с помощью бинокулярной лупы, так как на поверхности свежего корма Н отложенные яйца отчетливо видны.

Время накопления когорты. Тестирование мух на ПЖ проводилось в когортах. Мухи, вышедшие из куколок в течение трех-пяти дней (время, за которое удавалось накопить достаточное количество мух для тестирования), выпускались в стандартный бокс из оргстекла, как и те, в которых содержатся исходные линии. «Датой рождения» тестируемых мух условно считался средний день временного интервала, за который происходило накопление когорты мух для тестирования (второй день трехдневного интервала или третий день пятидневного интервала). Далее все тестируемые когорты выпускались в боксы одновременно, чтобы случайные флуктуации неконтролируемых факторов среды действовали

синхронно на все тестируемые линии, как сказано выше.

Корм. Корм, на котором проводилось тестирование, подавался в тестируемые когорты в чашках Петри диаметром 35 мм и высотой 7 мм и заменялся каждые три дня.

Поилка. В боксах с тестируемыми когортами размещалась поилка со смоченной ватой в пробирке или чашке Петри, служащая источником воды для мух.

Подсчет умерших мух. Каждый день, вплоть до гибели последней мухи, в боксах производился учет погибших мух, и определялся их пол. Самки и самцы каждой линии тестируются вместе (кроме Тестов 13 и 14, где отличия обусловлены задачами исследования, см. пункт 2.5 настоящего раздела).

Возрастная **динамика плодовитости** самок проводилась одновременно с тестированием когорт мух на ПЖ. Чтобы сопоставить количество яиц, откладываемое одной самкой определенного возраста за определенный период времени, свежий корм (в чашках Петри), на котором проводилось тестирование, изымался для подсчета отложенных яиц (через 1 ч или 24 ч после постановки), а затем возвращались обратно в бокс. Подсчет яиц производился вручную с помощью бинокулярной лупы.

Используемая в работе оценка плодовитости по числу отложенных яиц за определенный промежуток времени (1 ч или 24 ч) на свежий корм отражает не столько плодовитость в строгом смысле, сколько способность мух к быстрому освоению свежего корма для откладки яиц. Эта способность является важным компонентом приспособленности *D. melanogaster* в природных условиях, поскольку данный вид дрозофил специализируется на использовании эфемерных кормовых субстратов. С учетом приведенных пояснений в дальнейшем для краткости число яиц, откладываемых на свежий корм за определенный промежуток времени, будет называться «плодовитостью».

В пунктах 2.2.–2.5. приведено описание тестов мух из разных линий на ПЖ и плодовитость. Приведенная в настоящем параграфе методика тестирования

являются универсальной для всего исследования и для краткости далее повторяться не будут. Будет лишь обозначено, если в связи с особенностями проверяемой гипотезы тестирования проводились с отклонением от описанной процедуры.

В исследовании всего проведено 14 тестирований:

- Тесты 1-3 – тесты для оценки параметров жизненного цикла дрозофил, адаптированных к обедненному крахмальному корму (гомогенные условия);
- Тесты 4-7 – тесты для оценки параметров жизненного цикла дрозофил, адаптированных к гетерогенным условиям среды и соленому корму;
- Тесты 8-11 – тесты для оценки влияния дрожжевой микробиоты на параметры жизненного цикла дрозофил;
- Тесты 12-14 – тесты для оценки параметров жизненного цикла дрозофил в результате отбора на позднее размножение.

Из них:

- Тесты 1, 3, 6, 9, 12-14 нацелены на оценку продолжительности жизни дрозофил;
- Тесты 2, 7, 10 нацелены на оценку плодовитости самок;
- Тесты 4, 5 нацелены на оценку эффективности размножения дрозофил;
- Тесты 8, 11 нацелены на исследование дрожжевой микробиоты, ассоциированной с дрозофилами.

2.2. Тесты для оценки параметров жизненного цикла дрозофил, адаптированных к обедненному крахмальному корму (гомогенные условия) (Тесты 1–3)

Для оценки приспособленности мух к неблагоприятному крахмальному корму (с низким содержанием простых сахаров) когорты мух Мк и Мн (контроль) тестировались на ПЖ (Тест 1) и плодовитость (Тест 2) на крахмальном (К) и нормальном (Н, контрольном) кормах (Яковлева и др., 2016). В тестировании использовались линии, которые к его началу прожили в своих боксах 10 месяцев

(минимальное время смены поколений в условиях эксперимента – около двух недель).

Муhy для тестирования накапливались в течение трех дней после выхода из куколки и одновременно выпускались в боксы по 80–110 особей. Замену корма проводили после наступления темноты, так как освещенность существенно влияет на число яиц, откладываемых самкой. Через час после помещения свежего корма в боксы емкости с кормом изымали для подсчета отложенных яиц, а затем возвращали на место.

Для оценки реальной смертности имаго в ходе эволюционного эксперимента был проведен дополнительный тест (Тест 3). Мух Мн и Мк, подготовленных таким же образом, как и в тесте выше (Тест 1), тестировали в условиях, полностью соответствующих долгосрочному эволюционному эксперименту: корм Н или К подавался в пробирках (а не в чашках Петри), и заменялся раз в неделю (а не каждые три дня, как принято в стандартном протоколе по тестированию мух на ПЖ), остальные условия эксперимента полностью совпадали со стандартным протоколом тестирования (см. пункт 2.1 настоящего раздела) (Яковлева и др., 2016).

2.3. Тесты для оценки параметров жизненного цикла дрозофил, адаптированных к гетерогенным условиям среды и соленому корму (Тесты 4–7)

Данная серия тестов поставлена для оценки ПЖ и плодовитости мух, приспособленных к корму С в гомогенных условиях, а также чтобы оценить влияние пространственной гетерогенности среды на адаптацию *D. melanogaster* к неблагоприятным кормам (соленому и крахмальному (С и К) с возможностью выбора между ними). В тестах использовались линии мух, происходящие от одной исходной популяции дикого типа и адаптирующиеся к двум неблагоприятным кормам (С и К) либо в изолированных боксах с одним типом корма (гомогенная

среда, линия $Mс^2$), либо в двойном боксе, состоящем из двух отсеков с разными кормами и с возможностью миграции мух из одного отсека в другой (пространственно гетерогенная среда, линии $Mсс$ и $Mкс$) (Markov et al., 2016). В настоящем тестировании использовались линии мух, культивируемых на корме С (как в гомогенных так и в гетерогенных условиях), в котором концентрация соли постепенно (на 0,5% каждые 6 месяцев) увеличивалась от 3,5 до 5% к моменту начала тестирования осенью 2016 г. К этому моменту линии находились в условиях эксперимента 21 месяц, что примерно соответствует 15–40 поколениям (поколения в эксперименте перекрываются).

2.3.1 Тест для оценки эффективности размножения (Тесты 4 и 5)

Имаго, случайным образом отловленные с помощью эксгаустера из экспериментальных боксов линий $Mн$, $Mс$, $Mсс$ и $Mкс$, были помещены в стандартные пробирки с кормом Н: по две самки и два самца в каждую из 10 пробирок. Эти мухи представляли родительское поколение (Р) и содержались в пробирках в течение 5 суток. Для определения пола мухи предварительно обездвигивались холодом. В тестировании использовалось поколение потомков (F_0), развившееся из этих пробирок. Выращивание мух в течение одного поколения на благоприятном корме Н, так же, как и в других тестах, проводилось с целью снятия материнского эффекта и неблагоприятного влияния корма. Каждая из четырех линий тестировалась на трех типах корма: Н, К, С (с 4% поваренной соли, умеренно стрессовые условия) (Тест 4). Для каждой из 12 комбинаций «линия мух / тип корма» использовалось по 17 стандартных пробирок с соответствующим кормом. В каждую пробирку были посажены по два самца и две самки F_0 (все мух брались молодого сопоставимого возраста). В ватные пробки пробирок с кормом С вставлялись пластиковые эппендорфы с отрезанным доннышком, заполненные

² Для тестирования линии $Mк$ в тот момент не набралось необходимого количества мух, так как крахмальный корм является крайне стрессовым, и популяция мух $Mк$ характеризуется волнами высокой и низкой численности. Однако, линия $Mк$ уже была протестирована на адаптацию к своему неблагоприятному корму ранее, см. пункт 2.2.

мокрой ватой (поилки). Вата в эппендорфах смачивалась ежедневно (по 0,4 мл воды на пробирку), чтобы мухи не погибли от обезвоживания. Особенно обезвоживанию подвержены мухи, тестируемые на соленом корме, но для сопоставимости условий поилками оснащались все пробирки. Родительские особи (F_0) удалялись через 5 сут с момента посадки. Подсчет и удаление вылетевших потомков (имаго F_1) производилось ежедневно, начиная со дня вылета первой мухи и вплоть до 17-го (при тестировании на корме Н) или 27-го (на кормах С и К) дня с момента посадки F_0 .

Дополнительно все четыре линии, а также линия Мк, были протестированы аналогичным образом на корме С с 5,5% поваренной соли (крайне стрессовые условия) (Тест 5). Мухи F_0 рассаживались по одной паре в пробирки 13x100 мм с кормом С с 5,5% соли; имаго F_1 подсчитывались ежедневно до полного прекращения вылета (25 сут с момента посадки F_0); для каждой из пяти линий мух использовалось по 11 пробирок; в остальном всё делалось так же, как в Тесте 4 выше.

В тестировании для линий Мс и Мк контролем выступала линия Мн, для линии Мсс контролем выступали линии Мн и Мс, а для линии Мкс – линии Мк и Мн.

2.3.2 Тест для оценки ПЖ и возрастной динамики плодовитости (Тесты 6 и 7)

Линии Мн, Мс и Мсс тестировались на ПЖ (Тест 6) и плодовитость (Тест 7) на кормах Н и С с 4% соли. Для линии Мс контролем выступала линия Мн, для линии Мсс контролем выступали линии Мн и Мс. В каждый бокс одновременно было выпущено по 150–180 мух. Когорты формировались аналогично тесту, описанному в пункте 2.3.1 данного раздела, тестирование проводилось по стандартному протоколу, описанному в пункте 2.1.

Через час после помещения свежего корма Н в боксы емкости с кормом изымались для подсчета отложенных яиц, а затем возвращались обратно. На корме

С подсчет яиц осуществлялся через 24 часа после его замены, поскольку мухи крайне неохотно откладывают яйца на свежий корм С (Тест 7).

В боксы помещались по две поилки, представляющие собой чашки Петри со смоченной ватой. Поилки увлажнялись ежедневно, а вата заменялась поочередно каждые 12 дней (сначала в правой поилке, через шесть дней – в левой, еще через шесть дней в правой и так далее до конца тестирования). Замена ваты в поилках была рассинхронизирована с днями замены корма. Поилки и поочередная их смена, не совпадающая с днями смены корма, использовались, чтобы в боксе (на корме или в поилках) сохранялась микробиота, которая, по-видимому, важна для выживания *D. melanogaster* на соленом корме (Панченко и др., 2017; Dmitrieva et al., 2019). В тестах на корме Н поддерживались такие же условия для сопоставимости полученных результатов (Горшкова и др., 2018).

2.4. Тесты для оценки влияния дрожжевой микробиоты на параметры жизненного цикла дрозофил (Тесты 8–11)

Влияние дрожжевой микробиоты и отдельных ее компонентов на параметры жизненного цикла дрозофил тестировалось на контрольной линии мух Мн (сложившаяся дрожжевая микробиота которой в настоящем исследовании именуется «естественной») и линии Мбд (характеризующейся обедненной дрожжевой микробиотой).

В работе изучено влияние следующих компонентов микробиоты на параметры жизненного цикла дрозофил:

- Естественная микробиота линии Мн полностью;
- Дрожжи *Starmerella bacillaris* – вид, который доминирует в дрожжевом сообществе мух, адаптированных к корму с повышенным содержанием соли (Ивницкий и др., 2018);
- Дрожжи *Zygosaccharomyces bailii* – вид, который доминирует в дрожжевом сообществе мух, культивируемых на стандартном благоприятном лабораторном корме Н;

- Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – пекарские дрожжи, используются в качестве контроля, так как редко встречаются у дрозофил как в природе, так и в лабораторных линиях (Hoang et al., 2015), но входят в состав стандартного лабораторного корма в инактивированном виде.

Далее используются обозначения S.b – корм Н, засеянный видом дрожжей *S. bacillaris*, Z.b – *Z. bailii*, S.c – *S. cerevisiae*.

Чистые культуры обозначенных видов дрожжей выделены из линий дрозофил, содержащихся в лаборатории. Более подробно они были описаны в статье С.Б. Ивницкого с соавторами (Ивницкий и др., 2018).

Линия Мн с естественной микробиотой выступает контролем для линии Мбд с обедненной дрожжевой микробиотой. Корм Н без подсева живых дрожжей выступает контролем с кормам с подсевами. Корм Н с подсевом пекарских дрожжей, Н + S.c, – контроль для кормов с подсевами остальных дрожжей, Н + S.b и Н + Z.b.

2.4.1 Проверка состава дрожжевой микробиоты дрозофил перед началом тестирования (предварительный посев, Тест 8).

Перед началом тестирования для подтверждения отсутствия дрожжевой микробиоты в линии Мбд и наличия естественной микробиоты в линии Мн был проведён микробиологический посев. Десять мух из каждой линии отбирались случайным образом, обездвигивались с помощью углекислого газа и помещались в стерильные центрифужные микропробирки с 1 мл стерильной воды. Насекомые растирались стерильной стеклянной палочкой, после чего полученный гомогенат встряхивался в течение 15 минут на вортекс-шейкере Heidolph Multi Reax (Германия) на максимальной скорости (1980 об/мин).

Из полученной суспензии отбиралось по 50 мкл, которые наносились на поверхность плотной питательной среды GPYA (глюкоза – 20 г/л, пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, агар – 20 г/л) с добавлением антибиотика левомицетина (1 г/л). Среда была заранее разлита в чашки Петри диаметром 85 мм. Посев

распределялся по поверхности среды с помощью стерильного шпателя Дригальского. Посев производился в 10-кратной повторности.

Чашки инкубировались при температуре 20–22 °С в течение 4–5 суток. Определение принадлежности выросших колоний к дрожжам или бактериям проводилось по микроморфологическим признакам с использованием микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия).

2.4.2 Тестирование влияния отдельных компонентов дрожжевой микробиоты на ПЖ и динамику плодовитости дрозофил (Тесты 9 и 10).

Линии мух Мн и Мбд тестировались на корме Н, не содержащем жизнеспособных дрожжей (это способ оценить влияние «естественной» микробиоты, которой обладает линия Мн), а также на корме Н, засеянном одним из следующих видов дрожжей: *S. bacillaris*, *Z. bailii* или *S. cerevisiae*. Для приготовления корма Н, засеянного одним из указанных видов дрожжей, использовался 1 мл стерильной воды, в котором разводилась биомасса чистой культуры одного из видов дрожжей объемом 3 мм³. Полученная суспензия встряхивалась в течение трех минут на вортекс-шейкере Heidolph Multi Reax (Германия) в режиме 1980 об./мин. Готовая суспензия в стерильных условиях наносилась на корм Н из расчета 10 мкл на чашку Петри, диаметром 35 мм, и растиралась стерильным стеклянным шпателем Дригальского. Далее подготовленные чашки Петри заклеивались пленкой Parafilm и в течение 2,5 суток инкубировались при температуре 24–26 °С, чтобы дрожжи успели размножиться на поверхности корма.

Когорты мух для тестирования на ПЖ (тест 9) и плодовитость (тест 10) формировались следующим образом. Имаго, выловленные случайно при помощи эксгаустера из линий Мн и Мбд, были посажены по две самки и два самца на 5 суток в 10 стандартных пробирок с кормом Н («родители»). Для определения пола мухи обездвиживались холодом. Поколение потомков (F0), полученное из этих пробирок, участвовало в тестах на ПЖ и плодовитость по стандартному протоколу (пункт 2.1 настоящего раздела).

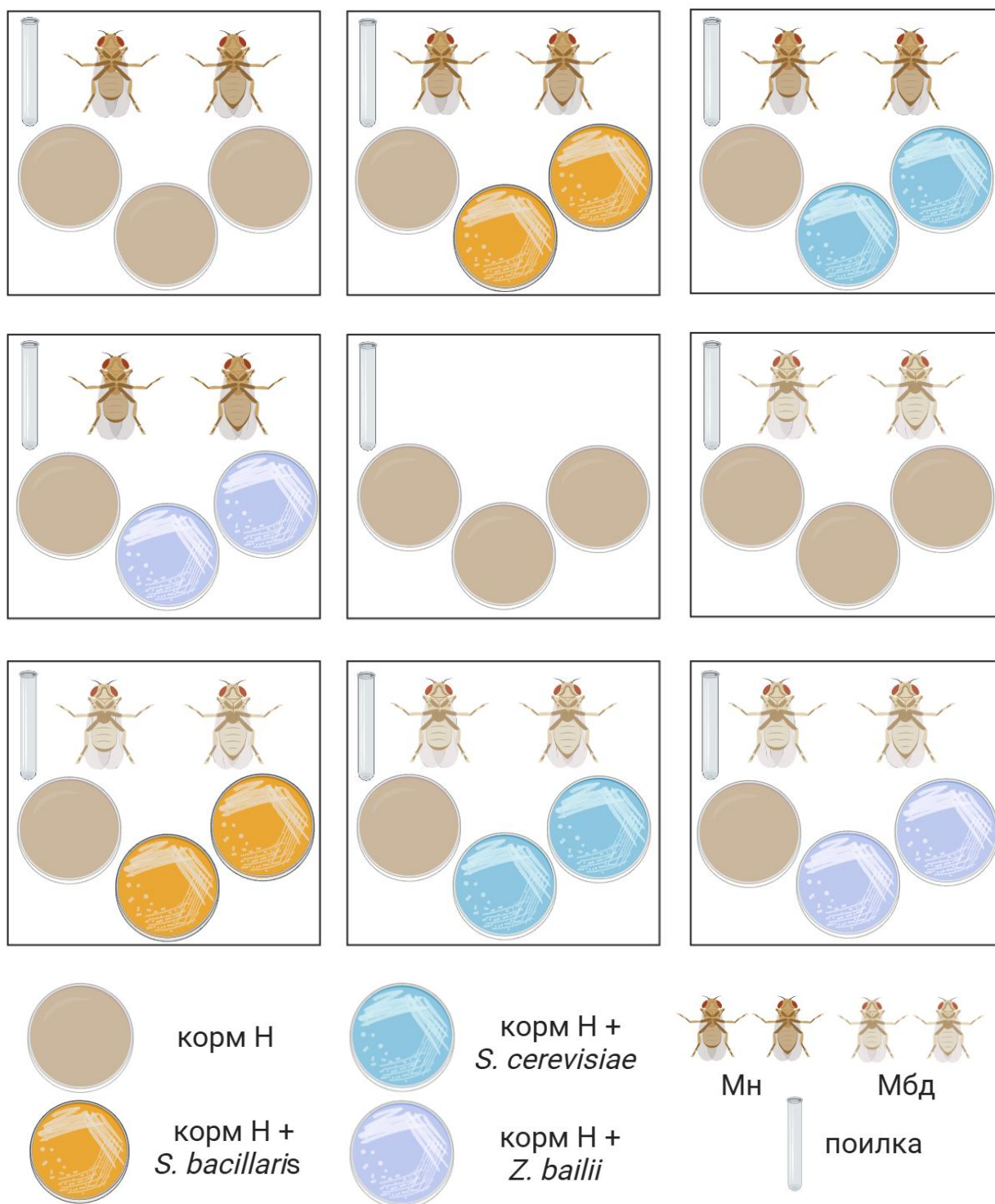


Рисунок 2. Дизайн Тестов 9 и 10 по оценке влияния различных компонентов дрожжевой микробиоты на продолжительность жизни и плодовитость дрозофил из линий Мн и Мбд.

Когорты мух накапливались в трех дней и выпускались в боксы одновременно по 115–125 мух. Дизайн тестирования представлен на рис. 2: в бокс

ставились либо по три чашки Петри с кормом Н, либо одна чашка с кормом Н и две чашки с кормом Н, засеянным одним из видов дрожжей. В каждый бокс помещалась поилка – пробирка с водой, закрытая влажной ватой. Через час после постановки свежего корма в бокс проводился подсчет отложенных яиц. Для возможности отслеживать случайную контаминацию боксов микробиотой извне, в тест был включен бокс, содержащий корм Н и поилку, но не содержащий мух (центральный квадрат на рис. 2). С данным боксом проводились те же манипуляции, как и с боксами, в которых содержались мухи.

2.4.3 Посев микробиоты, развивающейся на освоенном мухами корме (контрольный посев, Тест 11).

Через семь недель после начала тестирования был произведен посев трехдневного корма из всех вариантов теста с целью контроля развивающейся дрожжевой микробиоты в боксах. Кроме того, для отслеживания возможной контаминации в чистые боксы, не содержащие мух, были поставлены чашки Петри с кормом Н, засеянным каждым из видов дрожжей, используемых в тесте. Через три дня микробиота с данных чашек также исследовалась посевом.

В стерильной пробирке, содержащей 10 мл стерильной воды, разводился корм объемом 3 мм³. Суспензия высевалась по той же методике, как и в предварительном посеве (Тест 8), в 10-кратной повторности на каждый вариант теста. Чашки с посевами инкубировались в течение 4–5 суток при комнатной температуре (20-22°C). После чего производился подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) дрожжей с помощью бинокулярной лупы (ЛОМО, Россия) в десяти полях зрения, выбранных случайным образом. Далее результаты усреднялись и пересчитывались на площадь чашки Петри диаметром 85 мм.

Виды дрожжей, используемые в тестировании, хорошо различаются по морфологическим признакам, поэтому ДНК-идентификация большинства типов дрожжей, встречающихся на посевах, не проводилась. Колонии, морфологически отличающиеся от всех подсеянных на корм дрожжей, были идентифицированы

путем анализа нуклеотидных последовательностей ITS региона рДНК, аналогично тому, как описано в работе Дмитриевой с соавторами (Дмитриева и др., 2022). Полученные последовательности депонированы в базе данных GenBank NCBI под номерами OR462337-OR462340 (Яковлева и др., 2024).

2.5. Тесты для оценки параметров жизненного цикла дрозофил в результате отбора на позднее размножение (Тесты 12–14)

Линия дрозофил Ма произошла от контрольной линии мух Мн и подверглась отбору на позднее размножение. ПЖ отобранных когорт измерена для 1, 3-10, 16-18 поколений отбора. На мухах, полученных от 9-го поколения (когорты) мух линии Ма, было проведено тестирование, нацеленное на сопоставление ПЖ отбираемой линии Ма и контрольной (предковой) линии Мн (Тест 12). Обнаружив значимое увеличение ПЖ в линии Ма по сравнению с предковой линией Мн, содержащейся в стандартных условиях и не подвергавшейся искусственному отбору (Тест 12), было проведено тестирование для оценки относительного вклада генетических, социальных и микробиологических факторов в наблюдаемые различия по ПЖ. Для этого мы сравнили ПЖ самцов и самок мух из трех линий (опытной (Ма) после 14 поколений отбора и двух контрольных (Мн и Мбд), различающихся по условиям содержания и ПЖ) при совместном проживании с самками и самцами из той же самой или другой линии, в разных комбинациях (Тест 13, или тест на совместное проживание). Этот опыт и длительные измерения ПЖ в отбираемых когортах линии Ма показали, что наблюдаемое увеличение ПЖ у мух, отбираемых на позднее размножение, по сравнению с предковой линией, невозможно объяснить одними лишь генетическими факторами, и что социальные и (или) микробиологические факторы, по-видимому, вносят существенный вклад в наблюдаемые различия по ПЖ. Прямая экспериментальная оценка влияния перечисленных факторов на изменчивость параметров жизненного цикла дрозофил затрудняется тем, что эффекты разных факторов могут быть сложным образом переплетены, и во многих случаях их трудно отделить друг от друга. В связи с этим

мы провели еще одну серию тестов (Тест 14, или тест на самках), в которых, манипулируя микробным населением дрозофил и их корма, мы прицельно охарактеризовали роль микробиоты в изменении ПЖ под действием отбора.

2.5.1 Тестирование результатов отбора на позднее размножение (Тест 12).

Чтобы оценить эффективность проведенного отбора на позднее размножение, потомки мух из линии Ма и предковой к ней линии Мн одновременно тестировались на ПЖ. Для тестирования в линии Ма брались потомки не старых родителей, а мух из линии Ма в возрасте 14–17 дней (из когорты, 9-е поколение отбора). Яйца для получения тестируемой когорты линии Мн были собраны в популяционном боксе, в котором обитают мухи разных возрастов, поэтому возраст родителей не отслеживался. Однако ранее нами было показано, что пик плодовитости самок в линии Мн приходится на возраст 2–4 недели, поэтому можно считать, что в данном тестировании участвовали мухи, полученные от родителей сопоставимого возраста, и такой фактор, как возраст родителей, вряд ли мог сильно повлиять на результаты тестирования (Яковлева и др., 2016; Горшкова и др., 2018).

Когорты мух накапливались в течение трех дней после выхода из куколки. В тесте использовалось два бокса: с мухами Ма (122 особи, опыт) и мухами Мн (135 особей, контроль). Самцы и самки содержались вместе на протяжении всего теста. Тестирование проводилось на корме Н. Поилка в виде пробирки с ватой заменялась каждые две недели.

2.5.2 Тест для оценки влияния социальных и микробиологических факторов на ПЖ дрозофил в опыте с совместным проживанием мух из разных линий (Тест 13, или тест на совместное проживание)

Обнаружив в Тесте 12 значительные различия по ПЖ между контрольной (Мн) и экспериментальной (Ма) линиями мух, мы поставили задачу выяснить, обусловлено ли это только генетическими факторами (связанными с отбором

аллелей генов, ассоциированных с долголетием), которые исторически предполагаются в таких случаях по умолчанию, или вклад иных факторов также присутствует. Для детекции влияния социального (связанного с половым поведением) и микробиологического факторов, наряду с генетическим, мы сравнили ПЖ мух из линий Мн, Ма и Мбд (единого происхождения, но с разной историей культивирования и искусственного отбора). При этом тестировали мух при совместном проживании с особями противоположного пола либо из той же самой («своей»), либо из другой линии. Тестировалось шесть вариантов совместного проживания: самцы Мн с самками Мн ($\sigma^{\text{Мн}}\text{♀}\text{Мн}$), $\sigma^{\text{Мн}}\text{♀}\text{Мбд}$, $\sigma^{\text{Мбд}}\text{♀}\text{Мн}$, $\sigma^{\text{Ма}}\text{♀}\text{Ма}$, $\sigma^{\text{Ма}}\text{♀}\text{Мбд}$, $\sigma^{\text{Мбд}}\text{♀}\text{Ма}$.

Мухи готовились к тестированию так же, как в Тесте 12. В каждый бокс выпускалось от 86 до 101 самки и от 64 до 80 самцов, в зависимости от имеющегося количества особей, выращенных в стандартных условиях. Тестирование проводилось на корме Н. Поилка заменялась каждые две недели.

Вариант теста $\sigma^{\text{Мбд}}\text{♀}\text{Мбд}$ не рассматривался, так как в тестировании исходно не ставилась задача выяснить ПЖ мух из линии Мбд. Данная линия использовалась лишь в качестве вспомогательной, чтобы оценить ПЖ самцов и самок Мн и Ма при совместном проживании со «своими» и «чужими» партнерами (социальный фактор).

Ожидаемые эффекты социальных, микробиологических и генетических факторов были следующими:

1) В случае значительной роли **социальных факторов** (таких как различия между линиями по степени агрессивности мужской конкуренции и ухаживания) мы ожидали увидеть, что самки из одной и той же линии будут демонстрировать разную ПЖ при совместном проживании с разными самцами. Влияние самок на ПЖ самцов представляется менее вероятным, однако дизайн тестирования позволяет выявить и его тоже: в этом случае самцы из одной и той же линии будут демонстрировать разную ПЖ при совместном проживании с разными самками.

2) В случае значительной роли **микробиоты**, учитывая ее потенциальную

заразность (горизонтальную передачу), мы ожидали увидеть сильное и однотипное (однонаправленное) влияние партнеров обоего пола из определенной линии на ПЖ как самцов, так и самок из другой линии. Например, если у линии X присутствует микробиота, негативно влияющая на ПЖ, то можно ожидать, что мухи обоего пола из других линий будут жить меньше, если их партнерами являются мухи из линии X.

3) Если наследственная изменчивость по ПЖ в исходной природной популяции была высока, то отбор на долголетие (позднее размножение) должен оказаться эффективным, что соответствует значительной роли **генетических факторов**. В этом случае мы ожидаем увидеть, что у самцов и самок из линии, отбираемой на долголетие, средняя ПЖ окажется значительно больше, чем в двух других линиях, не подвергавшихся искусственному отбору.

2.5.3 Оценка ПЖ самок с обедненной собственной микробиотой в присутствии микробиоты Ма или Мн (Тест 14, или тест на самках)

Тест нацеливался на проверку влияния микробиоты мух Ма и Мн на ПЖ самок из линий Ма, Мн и Мбд. В данном случае тестировались мухи только одного пола (самки), чтобы нивелировать влияние на ПЖ социальных факторов, связанных с половым поведением и конфликтом полов.

В работе Дмитриевой А.С. и соавторов было показано, что самая богатая микробиота характерна для дрозофил в возрасте около недели, тогда как у мух, только что вышедших из куколки, микробиота резко обеднена. Иными словами, из куколки выходит муха почти без микробов и приобретает свою микробиоту в процессе жизни на освоенном другими мухами субстрате. Эти данные определили дизайн тестирования: процесс получения мух с обедненной микробиотой и дальнейшее содержание их в присутствии мух-доноров тестируемой микробиоты (Дмитриева и др., 2021).

В тесте использовались мухи из линий Ма и Мн в качестве доноров микробиоты и когорты мух с обедненной микробиотой из линий Ма, Мн и Мбд, в

качестве акцепторов микробиоты. Мухи-доноры выращивались на корме Н и содержались до 7-дневного возраста в исходных пробирках с кормом, освоенным мухами из их линии. Далее в линиях мух-доноров были отобраны самки, для маркировки им были отрезаны кончики крыльев. По 20–25 мух-доноров были за четыре дня до тестирования когорт выпущены в боксы для распространения соответствующей микробиоты.

Для получения когорт мух-акцепторов микробиоты, чья ПЖ измерялась в тесте, пробирки со стандартным кормом Н помещались в соответствующие популяционные боксы с линиями Ма, Мн и Мбд на три дня, в течение которых мухи могли откладывать в эти пробирки яйца. Еще через три дня в пробирки были вертикально помещены плашки из плотного картона. После того, как на плашках окуклилось достаточное число личинок (это заняло еще три дня), плашки были перенесены в пробирки с кормом Н с добавлением фунгицидного препарата нистатина и антибиотика сульфадиметоксина, что должно было затормозить развитие микробиоты на корме в то время, пока мухи завершают метаморфоз и выходят из куколок. Такая процедура потребовалась, чтобы минимизировать контакт выплывающихся мух с кормом, заселенными микробами, и, таким образом, получить мух с сильно обедненной микробиотой.

В течение трех дней после выхода из куколки первого имаго мухи накапливались в пробирке в нужном количестве для тестирования, далее были отобраны только самки. Они выпускались в заранее приготовленные и засеянные микробиотой (с помощью мух-доноров) боксы для тестирования по 100–110 особей.

В тестировании использовалось семь боксов: когорты самок Ма с обедненной микробиотой и самки с обрезанными крыльями, распространяющие микробиоту Ма (Ма/Ма), аналогично Мбд/Ма, Мн/Ма, Ма/Мн, Мбд/Мн, Мн/Мн и Мбд/Мбд. Вариант теста Мбд/Мбд – контроль, в качестве мух-доноров использовались мухи из популяционного бокса.

Корм Н подавался в двух чашках Петри диаметром 35 мм, каждые два дня из

бокса вынималась чашка с четырехдневным кормом и заменялась на новую, чтобы постоянно поддерживать источник микробиоты в боксе. Поилка заменялась каждые две недели. Подсчет умерших мух проводился ежедневно вплоть до гибели последней мухи. С помощью бинокля определялось состояние крыльев и соответственно устанавливалось, умерла ли тестируемая муха-акцептор или муха-донор. Для дальнейшего анализа использовались только данные по мухам-акцепторам (ПЖ мух, которые были донорами микробиоты, не анализировалась) (Яковлева и др., 2022).

3. Анализ данных

3.1. Продолжительность жизни, кривые дожития

Данные по возрастной динамике смертности представлены в виде кривых выживания – графиков, на которых по оси абсцисс отложен возраст имаго в сутках (от момента выхода из куколки), а по оси ординат – процент особей, доживших до данного возраста.

По данным о ПЖ в каждой из подопытных линий без разделения по полу, а также для самок и самцов в отдельности рассчитаны средняя ПЖ и её 95%-ый доверительный интервал, построенный методом бутстрэппинга; медианная ПЖ; стандартное отклонение; коэффициент вариации (КВ); квартильный коэффициент вариации (quartile coefficient of dispersion, ККВ), равный $((Q3-Q1)/2 Me)$ 100%, где $Q1$, $Q3$ – первый и третий квартили соответственно, Me – медианная ПЖ (она же второй квартиль) (Francis, 2008); Q_{max} , равная ПЖ 95% мух в когорте, так как данный показатель нередко используют в качестве оценки максимальной ПЖ.

Для ряда поколений линии Ma , отбираемой на позднюю репродукцию, для такого признака, как продолжительность жизни, рассчитан коэффициент наследуемости в узком смысле (реализованная наследуемость) согласно формуле $h^2 = \frac{R}{S}$, где S – селективный дифференциал (разность между средней ПЖ отобранных мух, то есть допущенных к репродукции, и мух в исходной когорте), R – ответ на отбор (разность между средней ПЖ потомков отобранных мух и мух в исходной когорте) (Futuyma, 2005, pp. 305-306).

3.2. Проверка гипотез о вкладе различных факторов в значимые отличия мух по ПЖ, плодовитости и эффективности размножения

Оценку влияния различных факторов (линии мух, пола, типа корма и/или подсева дрожжей на корм) на продолжительность жизни (Тесты 1, 6, 9), плодовитость (Тесты 7, 10; расчет показателей см. ниже в п. 3.3) и эффективность размножения (Тесты 4 и 5) проводили путем дисперсионного анализа. Многофакторного – в Тестах 1, 6, 9–10 и однофакторного – в Тестах 4–5, 7.

Поиск значимых различий средней ПЖ между парами линий проводили с помощью теста Тьюки (Tukey, 1949) (Тесты 1, 6) и Ньюмена–Кейлса (Keuls, 1952) (Тесты 4–5, 7, 9–10), которые, в отличие от t-критерия Стьюдента, подходящего только для парных сравнений, учитывают и решают проблему множественных проверок статистических гипотез (*Multiple comparisons problem*). Значимыми считались различия при скорректированном р-значении, составившем меньше 5%.

Большинство рядов данных, представленных в исследовании, распределены нормально (проверено с помощью критерия Шапиро–Уилка), однако критерий Ньюмена–Кейлса устойчив к нарушениям данного требования. При достаточно больших выборках (к которым, несомненно, относятся данные, полученные в тестах на ПЖ) тест Тьюки также применяется для данных, не распределенных нормально.

Чтобы оценить, по-разному ли на среднюю ПЖ самцов и самок влияет подсев дрожжей (Тест 9), перед применением дисперсионного анализа данные по ПЖ мух, живущих на корме с подсевами, были нормированы на среднюю ПЖ мух (соответствующего пола), живущих на корме Н без подсева. Это позволяет исключить влияние полового диморфизма по ПЖ и выделить только «чистый» эффект влияния подсева дрожжей на ПЖ самцов и самок.

В Тестах 12–14 сопоставление кривых выживания проведено на основе логарифмического рангового критерия (log-rank test, для краткости также будем называть его логранговым критерием) – статистического метода для оценки различий по уровню выживаемости в двух и более независимых группах

организмов. Логранговый критерий – непараметрический, а значит, не подразумевает никаких предпосылок о распределении данных, поэтому нормальное распределение данных не требуется и не проверялось. Кроме того, критерий является ранговым, в связи с этим некорректно на его основании говорить, что в изучаемых когортах различается (или не различается) средняя или медианная ПЖ, правильнее делать вывод в целом, различается ли ПЖ в двух когортах. Выживаемость особей в когорте изображается с помощью кривых выживания (см. выше), поэтому критерий можно интерпретировать как способ сравнения кривых выживания (Peto et al., 1977; Clark et al., 2003). В случае множественных сравнений (Multiple comparisons problem) результаты логрангового критерия были скорректированы путем введения поправки Бенджамини–Хохберга (Benjamini, Hochberg, 1995; R Core Team, 2015).

Применение дисперсионного анализа с различными поправками на множественность парных сравнений (Тьюки, Ньюмена–Кейлса, Бенджамини–Хохберга и т. д.) и сопоставление кривых дожития с помощью логрангового критерия эквивалентны и дают сопоставимые результаты при поиске ответа на вопрос о вкладе тех или иных факторов в значимые различия по продолжительности жизни и плодовитости между лабораторными линиями дрозофил.

3.3. Оценка плодовитости

На основе данных о числе яиц, откладываемых в первый час после смены корма (или 24 ч. в Тесте 7), вычислялось среднее число яиц на одну самку (абсолютная плодовитость). Данные анализировались за весь период, когда в первый час после смены корма мухи откладывали ненулевое количество яиц. Для более удобного восприятия данных и элиминирования случайных колебаний динамика среднего числа яиц в расчете на одну самку, представленная на графиках, сглажена методом скользящей средней.

В Тесте 2, описанном в пункте 2.2. раздела «Материалы и методы», сравнение плодовитости между линиями проводилось для первых 50 дней жизни мух. Для этого использовали показатель «относительной плодовитости» – нормализованную разность среднего числа яиц, вычисляемую следующим образом: подсчитывалось среднее число яиц на одну самку первой и второй линий, а затем разность этих двух величин делилась на их полусумму. Для удобства интерпретации на графики наложен линейный тренд. Если наклон линейного тренда достоверно меньше нуля, значит, плодовитость первой из двух сравниваемых линий с возрастом снижалась относительно плодовитости второй линии. Если тренд пересекает горизонтальную ось, это значит, что в том возрасте, который соответствует точке пересечения, плодовитость двух линий совпадала. Наклон тренда отражает скорость снижения плодовитости первой линии по отношению ко второй.

Выбранный период для сравнения плодовитости линий (первые 50 дней жизни) обусловлен тем, что в течение этого срока в живых остается большое количество мух (в том числе самок), а основное количество яиц откладывается в первые 7 недель жизни. Кроме того, данные по поздней плодовитости могут быть искажены изначальной гетерогенностью когорты (если до позднего возраста доживают самые жизнеспособные самки, представляющие собой нерепрезентативную выборку из популяции в целом).

В Тестах 7 и 10 (пункты 2.3.2 и 2.4.2 раздела «Материалы и методы»), на основе данных по возрастной динамике плодовитости вычислялся показатель среднего возраста самки, откладывающей яйца (СВС). Эта величина рассчитана как сумма произведений возраста самок (в днях) на число яиц, отложенных самками в данном возрасте, деленное на общее число яиц, отложенных самками рассматриваемой линии за всю жизнь. Сопоставляя значения данного показателя для разных линий, можно сделать вывод о том, на более молодой или на более поздний возраст смещен пик репродукции. Ожидаемое число яиц, которое самка откладывает за всю жизнь, рассчитано как сумма произведений средней плодовитости самки в определенном возрасте на вероятность дожить до данного

возраста. Для краткости будем называть данный показатель суммарным коэффициентом плодовитости (СКП).

В Тесте 10 поиск значимых взаимосвязей между средней ПЖ и СВС и средней ПЖ и СКП проведен путем парных линейных регрессий.

3.4. Программы для статистической оценки и графического анализа данных

Расчеты и анализ данных проводились в программе Microsoft Excel и на языках R (RCoreTeam, 2015, 2021, 2024) и Python. Иллюстрации в работе выполнены в программах Microsoft Excel, Adobe Photoshop, Adobe Illustrator, GIMP, на языках R и Python, и с помощью портала BioRender.com.

В R использовались следующие пакеты:

- stats (функции aov() для дисперсионного анализа, shapiro.test() – тест Шапиро–Уилка на проверку нормальности распределения, TukeyHSD() – тест Тьюки, cor.test() – для расчета коэффициента корреляции и проверки нулевой гипотезы о том, что он равен нулю) (RCoreTeam, 2015, 2021, 2024);
- agricolae (функция SNK.test() – тест Ньюмена–Кейлса) (Mendiburu, 2023);
- ggplot2 (пакет для построения рисунков) (Wickham, 2011);
- tidyverse (набор пакетов для работы с таблицами данных) (Wickham et al., 2019);
- survival (пакет для расчета логарифмического рангового критерия) (Therneau, 2021).

В Python использовались библиотеки NumPy (Harris et al., 2020) и pandas (McKinney, 2010) для работы с данными и библиотеки Matplotlib (Hunter, 2007) и seaborn (Waskom, 2021) для построения рисунков.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изменение продолжительности жизни и возрастной динамики плодовитости дрозофил в ходе адаптации к неблагоприятным кормам (гомогенные условия)³

1.1. Продолжительность жизни мух, адаптированных к обедненному крахмальному корму (Тесты 1 и 3)

В табл. 1 и на рис. 3 представлены результаты теста на продолжительность жизни дрозофил, приспособленных к крахмальному корму (Тест 1). На рисунках *a*–*г* представлены кривые выживания дрозофил из линий Мн и Мк на кормах Н и К, на рисунке *д* отражены результаты теста Тьюки по попарному сравнению ПЖ. Многофакторный дисперсионный анализ показал, что и корм ($p < 0,0001$), и принадлежность к линии (Мн или Мк) ($p < 0,0001$), и пол ($p < 0,0001$) влияют на среднюю ПЖ, значимы также и все попарные взаимодействия между факторами. В тестировании можно выделить 12 пар вариантов теста, пригодных для содержательного сравнения средней ПЖ:

- фенотипическая пластичность: мухи одного пола из одной и той же линии на разных кормах, то есть самцы Мн на корма Н и К, самки Мн на корма Н и К, самцы Мк на корма Н и К, самки Мк на корма Н и К (четыре попарных сравнения);
- адаптивные изменения: мухи одного пола из разных линий на одном и том же корме, то есть самцы Мн и Мк на корме Н, и т. д. (четыре попарных сравнения);
- половой диморфизм: самцы и самки одной линии, тестируемые на одинаковом корме, вместе, в одном боксе (четыре попарных сравнения).

³ Результаты, изложенные в настоящем параграфе, опубликованы в следующих научных статьях автора: Горшкова А.А., Фетисова Е.С., Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние пространственной гетерогенности среды на адаптацию *Drosophila melanogaster* к неблагоприятным кормовым субстратам: результаты эволюционного эксперимента // Журнал общей биологии. — 2018. — Т. 79, № 1. — С. 3–17. EDN: YKWEUY
Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние адаптации *Drosophila melanogaster* к неблагоприятному кормовому субстрату на продолжительность жизни и возрастную динамику плодовитости // Биохимия. — 2016. — Т. 81, № 12. — С. 1721–1739. EDN: XGYNVR

Середина каждого отрезка на рис. 3, δ – разность средних значений ПЖ для сравниваемой пары (из ПЖ популяции, указанной в названии первой, вычитается ПЖ популяции, указанной второй), длина отрезка – 95% – доверительный интервал, построенный методом бутстрепинга. Если он пересекает вертикальную линию, соответствующую нулевой разности, то различие ПЖ не значимо, и наоборот, если весь отрезок уместается справа или слева от нулевой отметки, то различие ПЖ значимо на 5% уровне значимости согласно тесту Тьюки.

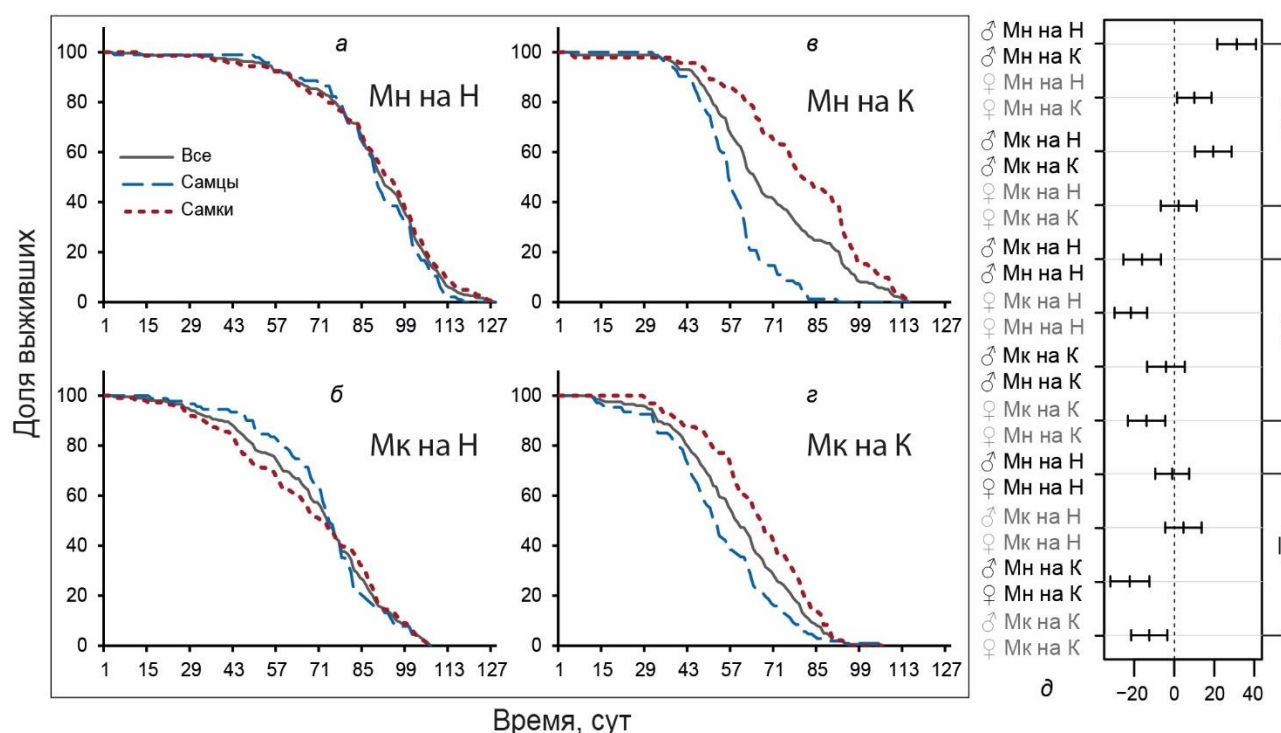


Рисунок 3. Результаты Теста 1. Кривые выживания мух *D. melanogaster* и сравнение средней ПЖ в разных линиях: для линии Мн при содержании на стандартном корме Н (а) и на обеднённом корме на основе крахмала К (в) (число особей обоих полов в каждой линии на корме Н и К соответственно, далее N: 239 и 174); для линии Мк на корме Н (б) и К (г) (N: 202 и 203). Показаны кривые для всех особей без разделения по полу, а также отдельно для самцов и самок. На рисунках а, б, в, г по горизонтальной оси – возраст когорты в сутках, по вертикальной – доля выживших особей в %. д – попарные сравнения средних ПЖ на основе теста Тьюки; по горизонтальной оси – разность средних ПЖ для сравниваемых пар (обозначены одним тоном), с 95-процентными доверительными интервалами; I – сравнения, отражающие фенотипическую пластичность, II – адаптивные изменения, III – половой диморфизм.

Таким образом, мы видим, что самцы обеих линий на корме К жили меньше, чем на Н (рис. 3, д, табл. 1). Негативное влияние корма К несколько сильнее сказалось на самцах Мн (самая высокая разница из всех пар), чем на самцах Мк, хотя это различие не достигает уровня статистической значимости (доверительные интервалы перекрываются).

Самки Мн, как и самцы, прожили дольше на корме Н, чем на К. Однако самки Мк показали примерно одинаковую ПЖ на обоих кормах. Таким образом, жизнь на корме К сокращает ПЖ мухам из обеих линий, но в адаптированной к корму К линии Мк это негативное влияние выражено слабее и распространяется только на самцов, тогда как в неадаптированной линии Мн оно выражено сильнее и затрагивает оба пола.

Таблица 1. Характеристики ПЖ мух Мн и Мк на кормах Н и К (Тест 1)

Корм	Н (благоприятный корм)						К (корм на основе крахмала)					
Линия	Мн			Мк			Мн			Мк		
Пол	Все	♂	♀	Все	♂	♀	Все	♂	♀	Все	♂	♀
Число особей (N)	239	96	143	202	91	111	174	82	92	203	107	96
Средняя ПЖ, сут	88,2	87,5	88,7	69,1	71,5	67,1	68,1	56,3	78,6	58,2	52,2	64,8
Медианная ПЖ, сут	90	88,5	93	73	73	72	64	55,5	79,5	58	51	66
Стандартное отклонение	20,0	17,9	21,5	22,0	18,5	24,4	21,2	12,0	22,1	18,6	18,2	16,8
КВ, %	22,7	20,5	24,2	31,8	25,9	36,3	31,1	21,4	28,1	31,9	34,8	25,9
ККВ, %	12,5	12,0	12,9	19,9	12,3	27,1	23,4	10,6	19,0	23,3	21,1	17,6

При анализе ПЖ важно учитывать различия между самцами и самками, так как половой диморфизм по этому признаку может быстро формироваться в ходе эволюции; он служит индикатором неоднородной генетической базы ПЖ у самцов и самок (Chen, Maklakov, 2012; Chen, Maklakov, 2014).

В линии Мн на корме Н отсутствует половой диморфизм по всем характеристикам кривых выживания (у самцов и самок они почти идентичны, рис. 3, а). Культивирование мух из той же линии на обедненном корме К привело к

резкому половому диморфизму: ПЖ у самцов сократилась достоверно сильнее, чем у самок (рис. 3, д).

В линии Мк половой диморфизм кривых выживания присутствует при культивировании на обоих кормах, однако характер этого диморфизма различен. На корме Н самцы Мк имеют пониженную раннюю и повышенную позднюю смертность по сравнению с самками, поэтому их кривая выживания более выпуклая, хотя средние значения ПЖ у двух полов близкие (рис. 3, б, д). Различие по степени выпуклости кривых выживания адекватно отражается значениями коэффициента вариации ПЖ (КВ, табл. 1): у самцов 25,9%, у самок 36,3%. Чем ниже КВ, тем более выпуклой является кривая выживания (Марков и др., 2016). При культивировании на корме К самцы Мк имеют пониженную среднюю ПЖ по сравнению с самками, кривая становится менее выпуклой (рис. 3, з, табл. 1). В целом половой диморфизм кривых выживания мух Мк на корме К имеет тот же характер, что и у мух Мн на том же корме, но меньше по абсолютной величине (рис. 3, в, з), хотя данное различие не достигает уровня статистической значимости (рис. 3, д).

Таким образом, непосредственное влияние обедненного корма К выражается в снижении ПЖ и усилении полового диморфизма кривых выживания. Это влияние сильнее сказывается на мухах из линии Мн, чем Мк. Сравнение ПЖ для мух из одной и той же линии на разных кормах отражает фенотипическую пластичность, то есть влияние корма на ПЖ без учета изменений, приобретенных в ходе адаптации.

Чтобы выявить эффект адаптации к обедненному корму, нужно сравнить ПЖ и кривые выживания линий Мн и Мк при культивировании на одинаковых кормах (рис. 3, а сравнить с рис. 3, б, а рис. 3, в – с рис. 3, з). На каждом из двух кормов мухи Мн живут дольше, чем мухи Мк (на 19,1 дней на корме Н и на 9,9 дней на корме К). Для самок это различие статистически значимо на обоих кормах, а для самцов оно достигает уровня статистической значимости только на корме Н (рис. 3, д). На корме К самцы Мк лишь слегка уступают самцам Мн по средней ПЖ, и

различия статистически не значимы (рис. 3, д, табл. 1).

Таким образом, адаптация к обедненной среде К привела к наследуемому сокращению ПЖ у самок и, в меньшей степени, у самцов Мк по сравнению с контрольной линией Мн. Направленность адаптивных изменений совпала с направлением фенотипической пластичности: вызываемое неблагоприятным кормом сокращение ПЖ стало проявляться даже при культивировании на благоприятном корме (Яковлева и др., 2016).

Для понимания причин описанных изменений ПЖ важно упомянуть, какие факторы влияют на дрозофил в ходе эволюционного эксперимента: на корме К к концу недельного цикла обычно происходит массовая гибель имаго, хотя личинки и куколки выживают. Напротив, на корме Н большинство имаго благополучно доживает до очередной смены корма. В результате в боксе, содержащем линию Мн, высокая плотность мух, а в боксе с Мк – на порядки ниже.

В ходе дополнительного теста (Тест 3), проведенного для линий Мк и Мн, когда корм подавался в пробирках и заменялся раз в неделю (имитируя условия долгосрочного эволюционного эксперимента), удалось показать, что жизнь на корме К (по сравнению с кормом Н) сократила среднюю ПЖ контрольных мух Мн на 52 сут (на 87% или в 7,7 раза): фактически вся когорта на корме К вымерла за первую неделю. Тогда как в тесте, описанном выше, когда корм подавался в чашках Петри и заменялся каждые три дня, жизнь на корме К (по сравнению с кормом Н) сократила среднюю ПЖ контрольных мух Мн на 20 сут, или на 23% (табл. 1).

1.2. Возрастная динамика плодовитости самок мух, адаптированных к обедненному крахмальному корму (Тест 2)

Возрастная динамика плодовитости показана на рис. 4 (Тест 2). На врезках показана абсолютная плодовитость (среднее число яиц в расчете на одну самку). Во всех случаях максимальная индивидуальная плодовитость наблюдается в возрасте 4–5 недель, однако в остальном возрастная динамика плодовитости различается у разных линий и на разных кормовых средах.

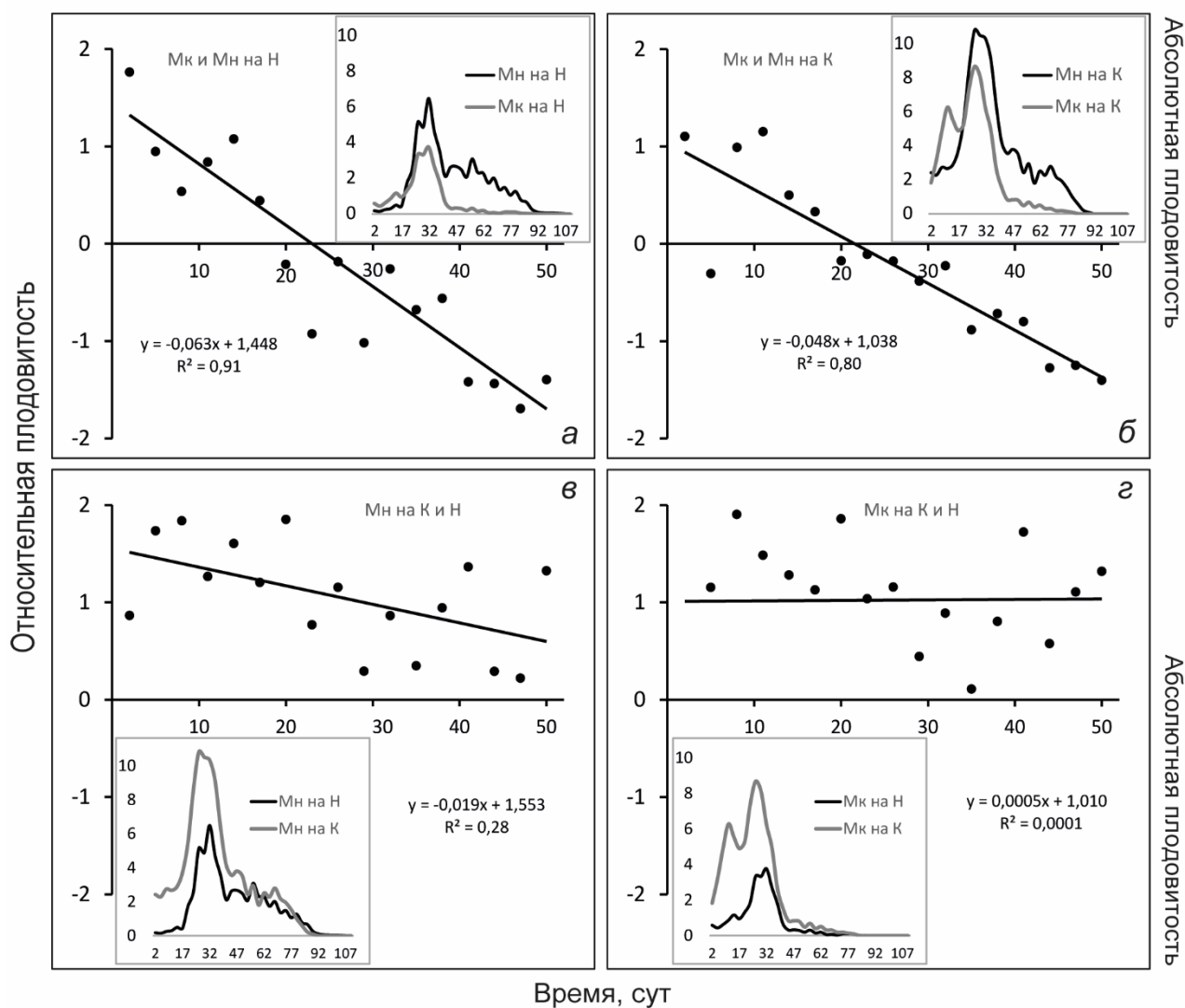


Рисунок 4. Результаты Теста 2. Возрастная динамика абсолютной (графики на врезках) и относительной плодовитости самок. *а* – сравнение плодовитости линий Мк и Мн на корме Н, *б* – сравнение тех же линий на корме К, *в* – сравнение плодовитости линии Мн на кормах К и Н, *г* – сравнение плодовитости линии Мк на кормах К и Н. По горизонтальной оси – возраст мух в сутках с момента выхода из куколки, по вертикальной – относительная плодовитость, то есть нормализованная разница плодовитостей двух сравниваемых линий (основные графики) и абсолютная плодовитость – среднее число яиц на одну самку (графики на врезках). Подсчет яиц производился через 1 ч после постановки свежего корма. Данные по абсолютной плодовитости сглажены при помощи метода скользящей средней.

Для сравнения плодовитости между линиями в первые 50 дней жизни рассчитана относительная плодовитость – нормализованная разность среднего числа яиц. Значения данного показателя изображены точками на рис. 4, для

отражения общей тенденции изменения показателя на графики наложена линия тренда.

Различия возрастной динамики плодовитости между линиями Мк и Мн иллюстрируются графиками относительной плодовитости (линии тренда на рис. 4, а, б). Положительные значения относительной плодовитости означают, что первая из двух сравниваемых линий (Мк) имеет более высокую плодовитость, чем вторая (Мн); отрицательные значения свидетельствуют о пониженной плодовитости первой линии по сравнению со второй. Таким образом, наклонные линии тренда на рис. 4, а, б означают, что в молодости мухи Мк опережают мух Мн по плодовитости, однако с возрастом их относительная плодовитость снижается. Примерно в трехнедельном возрасте плодовитости двух линий становятся одинаковыми, а в дальнейшем мухи Мн всё сильнее опережают мух Мк. Эта закономерность четко прослеживается при тестировании как на корме Н (рис. 4, а), так и на корме К (рис. 4, б). Таким образом, адаптация мух Мк к жизни на обедненном корме К привела к сдвигу репродуктивного усилия на более ранний возраст и к ускоренному снижению плодовитости с возрастом (репродуктивному старению) по сравнению с контрольными мухами Мн.

Непосредственное влияние корма (Н или К) выявляется при сравнении плодовитостей одной линии на двух кормах (рис. 4, в, г). Обе линии, Мн и Мк, демонстрируют повышенную плодовитость на корме К по сравнению с кормом Н в течение всего репродуктивного периода. Иными словами, корм К стимулирует ускоренную откладку яиц на свежий корм у обеих линий мух по сравнению с кормом Н. Различие между линиями состоит в том, что в линии Мн на корме К наблюдается снижение относительной плодовитости с возрастом (наклонная линия тренда на рис. 4, в), тогда как в линии Мк относительная плодовитость на корме К не меняется с возрастом (зависимость абсолютной плодовитости от возраста в этой линии одинакова на обоих кормах, о чем свидетельствует горизонтальная линия тренда на рис. 4, г).

Таким образом, у неадаптированных мух Мн жизнь на корме К стимулирует

ускоренную откладку яиц на свежий корм, особенно в молодом возрасте, а также ускоряет репродуктивное старение (рис. 4, в). Такова направленность фенотипической пластичности при переходе на обедненный корм. У мух Мк адаптация к корму К привела к изменениям сходной направленности. У них повышена плодовитость в молодом возрасте не только на К, но и на Н. Также, судя по сходной динамике относительной плодовитости Мк по отношению к Мн (близкие наклоны линий тренда на рис. 4, а, б), репродуктивное старение проявляется в линии Мк примерно в одинаковой степени на обоих кормах, и оно протекает быстрее, чем у линии Мн на корме К. Как и в случае с ПЖ, направленность адаптивных изменений возрастной динамики плодовитости совпадает с направлением фенотипической пластичности: стимулируемые кормом К у контрольных мух Мн рост ранней плодовитости и ускорение репродуктивного старения стали проявляться у адаптированных к корму К мух Мк на любом из кормов.

Интересно, что у мух Мк в ходе адаптации к корму К исчезла фенотипическая пластичность скорости репродуктивного старения в ответ на смену корма: у контрольных мух Мн культивирование на корме К ускоряет репродуктивное старение по сравнению со кормом Н (наклонная линия тренда на рис. 4, в), а у мух Мк характер изменения плодовитости с возрастом одинаков на обоих кормах (рис. 4, г) (Яковлева и др., 2016).

1.3. Продолжительность жизни мух, адаптированных к стрессовому соленому корму (Тест 6, гомогенные условия)

Корм С, так же, как и корм К, является стрессовым для дрозофил. Подтверждение того, что мух из линии Мс за несколько десятков поколений адаптировались к соленому корму, и количественная оценка этой адаптации приведены ниже в Тестах 4 и 5, а также в публикациях коллег кафедры биологической эволюции, в том числе в статье Дмитриевой и соавторов (Дмитриева и др., 2016). В литературе аналогично показана быстрая адаптация

дрозофил к соленому корму, за 30 поколений, и выявлены соответствующие генетические изменения на 2 и 3 хромосомах (Zhang et al., 2011).

Дисперсионный анализ показал, что переменные корма ($p < 0,0001$) и пола ($p < 0,0001$) (а также все попарные взаимодействия факторов, $p < 0,0001-0,02$)) значимо влияют на различия по ПЖ в линии Мс по сравнению с контрольной линией Мн, а переменная линии влияет не значимо ($p = 0,3637$).

На рис. 5 (интерпретируется аналогично рис. 3, д) представлено попарное сравнение ПЖ мух из одной линии (Мн или Мс) на разных кормах (С и Н), которое отражает влияние корма на ПЖ мух, то есть фенотипическую пластичность этого признака. Жизнь на корме С сильно сокращается как в линии Мн, не адаптированной к корму С (с 81,9 суток до 24,2 для самцов и с 59,6 до 19 суток для самок), так и в линии Мс, адаптированной к нему (с 75,8 суток до 23,7 для самцов и с 61,5 до 22,8 суток для самок) (Горшкова и др., 2018).

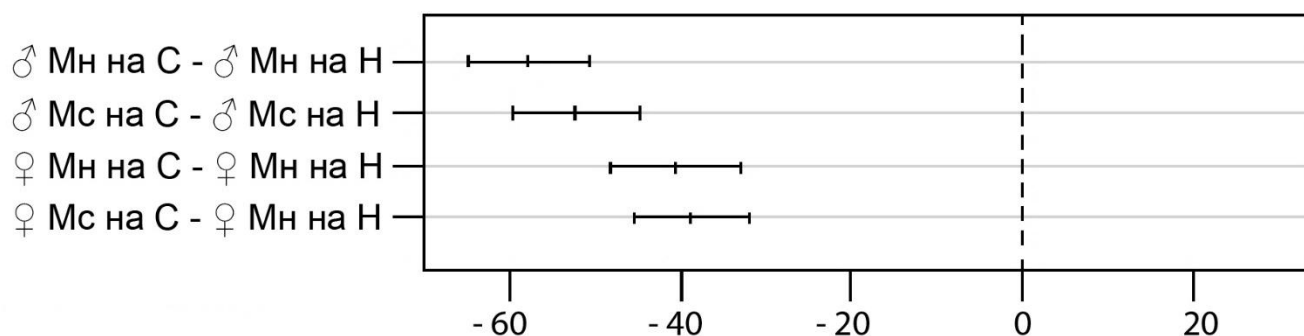


Рисунок 5. Результаты Теста 6, гомогенные условия. Попарные сравнения средних ПЖ для мух из линий Мс и Мн, тестируемых на разных кормах (фенотипическая пластичность), на основе теста Тьюки; по горизонтальной оси – разность средних ПЖ для сравниваемых пар с 95-процентным доверительным интервалом. N: Мн на Н ♂ 86 ♀ 63, Мн на С ♂ 78 ♀ 86, Мс на Н ♂ 72 ♀ 87, Мс на С ♂ 87 ♀ 93.

На рис. 6 (интерпретируется аналогично рис. 3, д) представлено попарное сравнение ПЖ самцов и самок из линий Мс и Мн на одинаковых кормах (С или Н), которое позволяет установить эффект адаптации линии Мс к корму С по сравнению с контрольной линией Мн. Согласно рисунку доверительные интервалы

пересекают нулевую отметку во всех случаях, это означает, что на обоих кормах ПЖ и самцов и самок линии Мс значимо не отличается от ПЖ контрольной линии Мн. Иными словами, адаптация к стрессовому корму С не привела к сокращению продолжительности жизни дрозидил из линии Мс.

Таким образом, в отличие от адаптации к корму К, при адаптации дрозидил к корму С сокращение ПЖ, вызываемое неблагоприятным кормом, не наблюдается при культивировании на благоприятном корме.

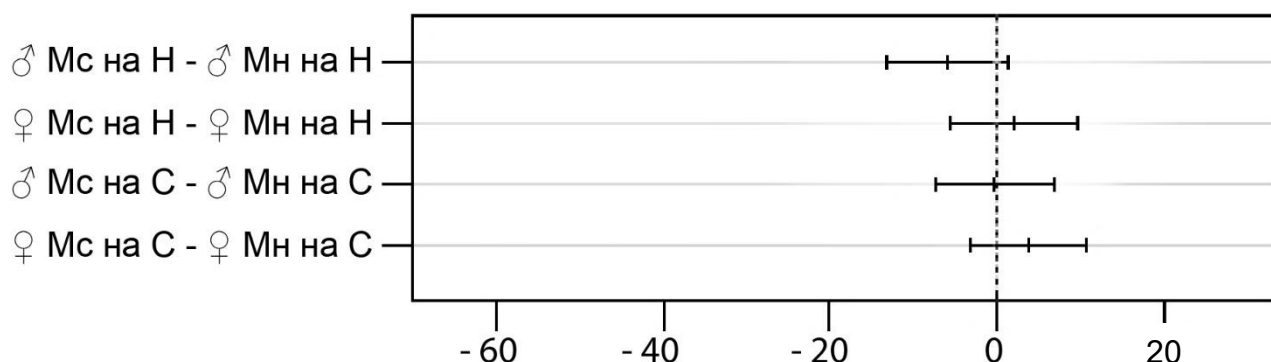


Рисунок 6. Результаты Теста 6, гомогенные условия. Парные сравнения средних ПЖ мух из линий Мс и Мн, тестируемых на одном корме (адаптивные изменения), на основе теста Тьюки; по горизонтальной оси – разность средних ПЖ для сравниваемых пар с 95-процентным доверительным интервалом. N: Мн на Н ♂ 86 ♀ 63, Мн на С ♂ 78 ♀ 86, Мс на Н ♂ 72 ♀ 87, Мс на С ♂ 87 ♀ 93.

1.4. Возрастная динамика плодовитости самок мух, адаптированных к стрессовому соленому корму (Тест 7, гомогенные условия)

Для оценки плодовитости измерялось число яиц, отложенных на свежий корм в течение часа (для корма Н) или в течение суток (для корма С) в расчете на одну самку (Тест 7, гомогенные условия). На основе данных наблюдений рассчитывался средний возраст самки, откладывающей яйца (СВС). На корме Н для линий Мн эта величина составляет 25,0 сут, а для Мс – 25,7 сут, различия статистически не значимы. На корме С – 6,2 сут для Мн и 7,9 сут для Мс, и различия также не достигают статистической значимости. Это можно интерпретировать, как

отсутствие возрастных смещений репродукции мух из линии Мс по сравнению с контролем.

Суммарный коэффициент плодовитости (СКП) самок Мн на корме Н составляет 27,6 яиц, что значимо больше, чем у самок Мс (23,3 яйца). На корме С тенденция аналогична, у самок Мн значимо больше среднее число яиц, отложенных в первые часы освоения корма, чем у самок Мс (4,1 против 2,4 яйца соответственно, различия статистически значимы). Несмотря на то, что подсчет яиц на корме С затруднен, можно заключить, что в результате адаптации к корму С суммарная плодовитость в линии Мс снизилась, причем согласно возрастной динамике плодовитости линий Мн и Мс, представленной на рис. 7, данное сокращение обусловлено пониженной плодовитостью в первой половине жизни, а не более быстрым репродуктивным старением.

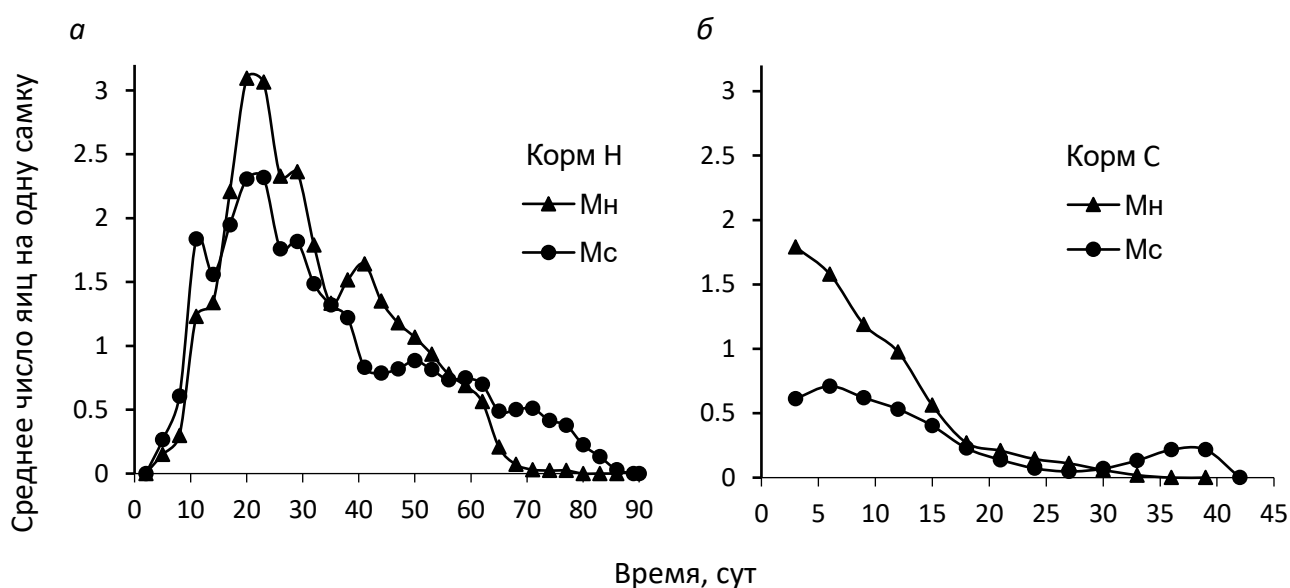


Рисунок 7. Тест 7, гомогенные условия. Возрастная динамика плодовитости самок из линий Мн, Мс на кормах Н (а) и С с 4% соли (б). По горизонтальной оси – возраст мух в сутках с момента выхода из куколки, по вертикальной – среднее число яиц в расчете на одну самку. На корме Н подсчет яиц производился через 1 ч после постановки свежего корма, на корме С – через 24 ч. Данные сглажены методом скользящей средней.

2. Оценка приспособленности и изменения продолжительности жизни и возрастной динамики плодовитости дрозофил в ходе адаптации к гетерогенным условиям среды⁴

2.1. Эффективность размножения (Тесты 4 и 5)

Эффективность размножения мух на том или ином корме может служить одним из показателей приспособленности к данному корму. Для линий Мн, Мк, Мс, Мсс и Мкс оценена эффективность размножения на кормах Н, К и С с 4% соли (Тест 4) и С с 5,5% соли (Тест 5) по числу потомков первого поколения (F_1), доживших до стадии имаго, которых произвели мухи поколения F_0 за фиксированное время на каждом из тестируемых кормов. Для снятия материнского эффекта мухи поколения F_0 получены на корме Н от родительских мух из соответствующих экспериментальных линий.

Динамика вылета имаго F_1 в тестах на эффективность размножения показана на рис. 8. Однофакторный дисперсионный анализ выявил, что принадлежность к той или иной линии (Мн, Мк, Мс, Мсс и Мкс) значительно влияет на различия суммарного выплода (для кормов Н, К и С с 4% соли $p < 0,0002$, для С с 5,5% соли $p = 0,035$). С помощью критерия Ньюмена–Кейлса установлено, в каких парах линий мух эффективность размножения значительно отличаются на 5% уровне значимости на каждом из кормов. Значимые различия показаны различными буквами над столбцами на рис. 8 (графики на врезках).

На корме Н во всех линиях вылет имаго F_1 начался на 12-й день от посадки родителей F_0 . Средний суммарный выплод за 6 сут (на 17-й день от посадки родителей F_0) в линии Мн составил 80,5 имаго на пробирку, что значительно выше, чем в других линиях. Суммарный выплод в линиях Мс, Мсс и Мкс составил 59,5, 63,3 и 67,6 имаго соответственно; данные величины статистически не различаются (рис. 8, а).

⁴ Результаты, изложенные в настоящем параграфе, опубликованы в следующей научной статье автора: Горшкова А.А., Фетисова Е.С., Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние пространственной гетерогенности среды на адаптацию *Drosophila melanogaster* к неблагоприятным кормовым субстратам: результаты эволюционного эксперимента // Журнал общей биологии. — 2018. — Т. 79, № 1. — С. 3–17. EDN: YKWEUY

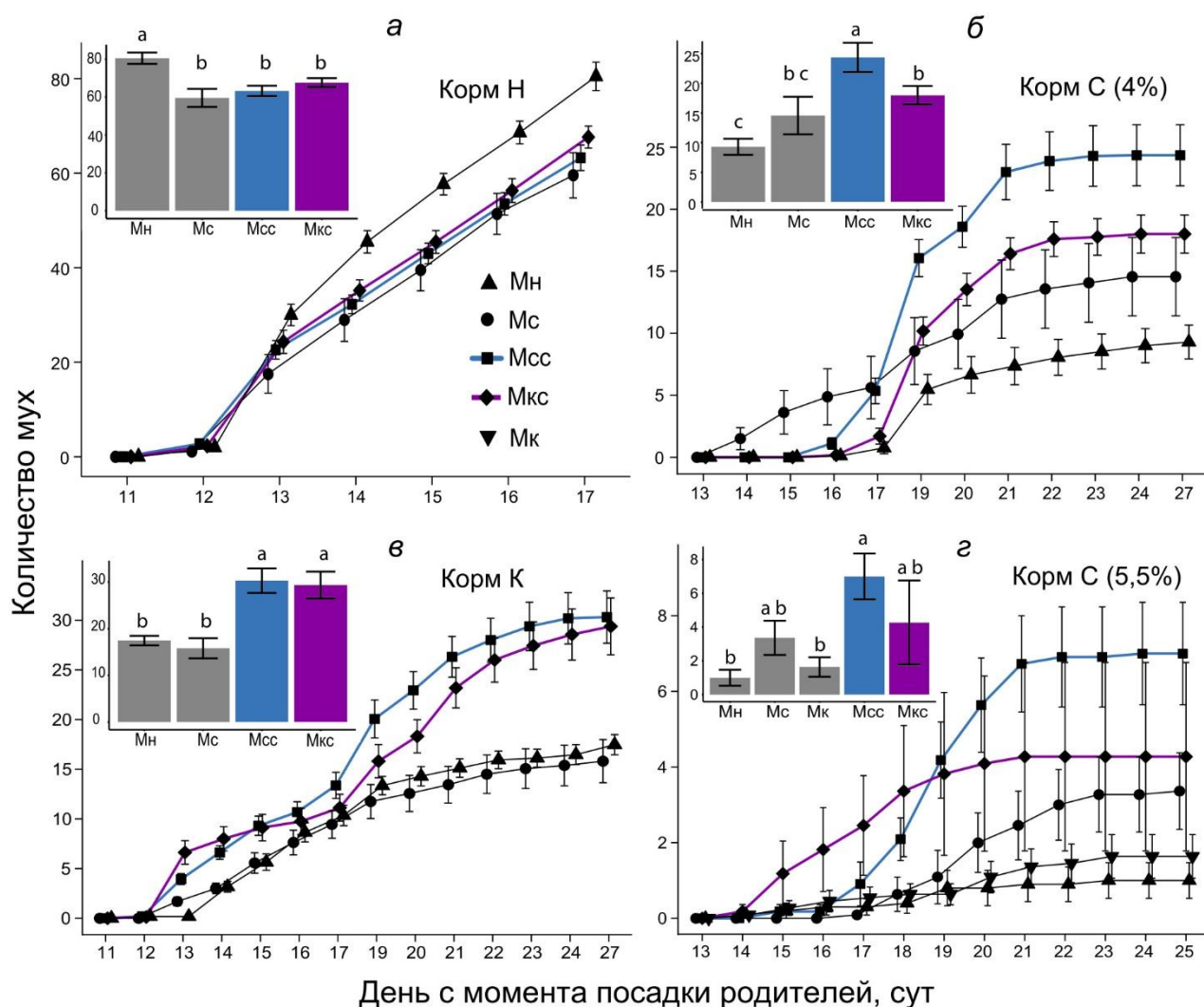


Рисунок 8. Результаты тестов на эффективность размножения: динамика выплода имаго F_1 и их суммарное число. Линии Мн, Мс, Мсс и Мкс протестированы на кормах Н (а), С с 4% соли (б), К (в) (Тест 4), С с 5,5% соли (г) (Тест 5). Линия Мк была протестирована только на С с 5,5% соли. Основной график: средний кумулятивный выплод (суммарное число имаго F_1 , вылетевших к данному дню) в расчете на одну пробирку; показана стандартная ошибка среднего. По горизонтальной оси – день с момента посадки родителей F_0 . Графики на врезках: кумулятивный выплод за период наблюдений и стандартная ошибка среднего; по горизонтальной оси – линия мух. Различные буквы над столбцами означают значимые различия на 5%-ном уровне значимости по результатам критерия Ньюмена–Кейлса.

На корме С с 4% соли выплод начался на два дня позже, чем на корме Н, – на 14-й день с момента посадки родителей F_0 . К 27-му дню в линии Мсс (то есть у мух, чьи родители были пойманы в «соленом» отсеке двойного бокса с кормами К и С),

выплод F_1 составил 24,4 имаго на пробирку, что значимо выше, чем в других линиях. В линии Мкс (у мух, чьи родители происходят из «крахмального» отсека двойного бокса) среднее число вылетевших потомков F_1 составило 18,0 имаго на пробирку, а в линии Мс – 14,6. Эти величины значимо не различаются, но выплод в линии Мкс значимо выше, чем в линии Мн (9,3 имаго на пробирку) (рис. 8, б).

На корме К во всех линиях первые имаго F_1 вышли из куколок на 12-й день (как и на корме Н), кроме линии Мс, в которой вылет начался на 13-й день. Выплод в линиях Мсс и Мкс происходил интенсивнее, чем в линиях Мн и Мс (рис. 8, в). К 27-му дню с момента посадки родителей F_0 средний выплод имаго F_1 в линиях Мсс и Мкс составил 30,3 и 29,4 мухи на пробирку, что значимо выше, чем в линиях Мн и Мс, где выплод равен 17,5 и 15,8 мух соответственно.

На корме С с 5,5% соли (крайне стрессовые условия, Тест 5) выплод имаго F_1 в линиях Мн, Мкс, Мк начался в то же время, что и на корме С с 4% соли, с 14-го дня. В двух других линиях он начался позже: Мсс – с 15-го дня, Мс – с 17-го. К 25-му дню, когда в пробирках не осталось живых личинок и куколок, суммарный выплод имаго F_1 в линии Мсс составил 7,0 мух на пробирку, что значимо выше, чем в линиях Мн и Мк (1,0 и 1,6 имаго соответственно). Суммарный выплод в линиях Мкс и Мс составил 4,3 и 3,4 мухи на пробирку; это больше, чем в линиях Мн и Мк, но различия не достигают уровня статистической значимости (рис. 8, г) (Горшкова и др., 2018).

2.2. Продолжительность жизни (Тест 6, гетерогенные условия)

Данные по ПЖ мух из линий Мн, Мс и Мсс на кормах Н и С с 4% соли представлены на рис. 9. По результатам дисперсионного анализа на 5%-ном уровне значимости и линия ($p < 0,0001$) и корм ($p < 0,0001$) достоверно влияют на различия средней ПЖ для самцов и для самок. Взаимодействие факторов значимо только для самок ($p = 0,0042$), но не для самцов ($p = 0,0706$).

Самки Мсс в среднем живут значимо дольше, чем самки Мн и Мс, как на корме Н (73,6 сут против 59,5 и 61,5 соответственно), так и на корме С (25,2 сут

против 19,0 и 22,8 сут соответственно, хотя последнее различие не достигает статистической значимости согласно консервативному тесту Тьюки) (рис. 9, б, г).

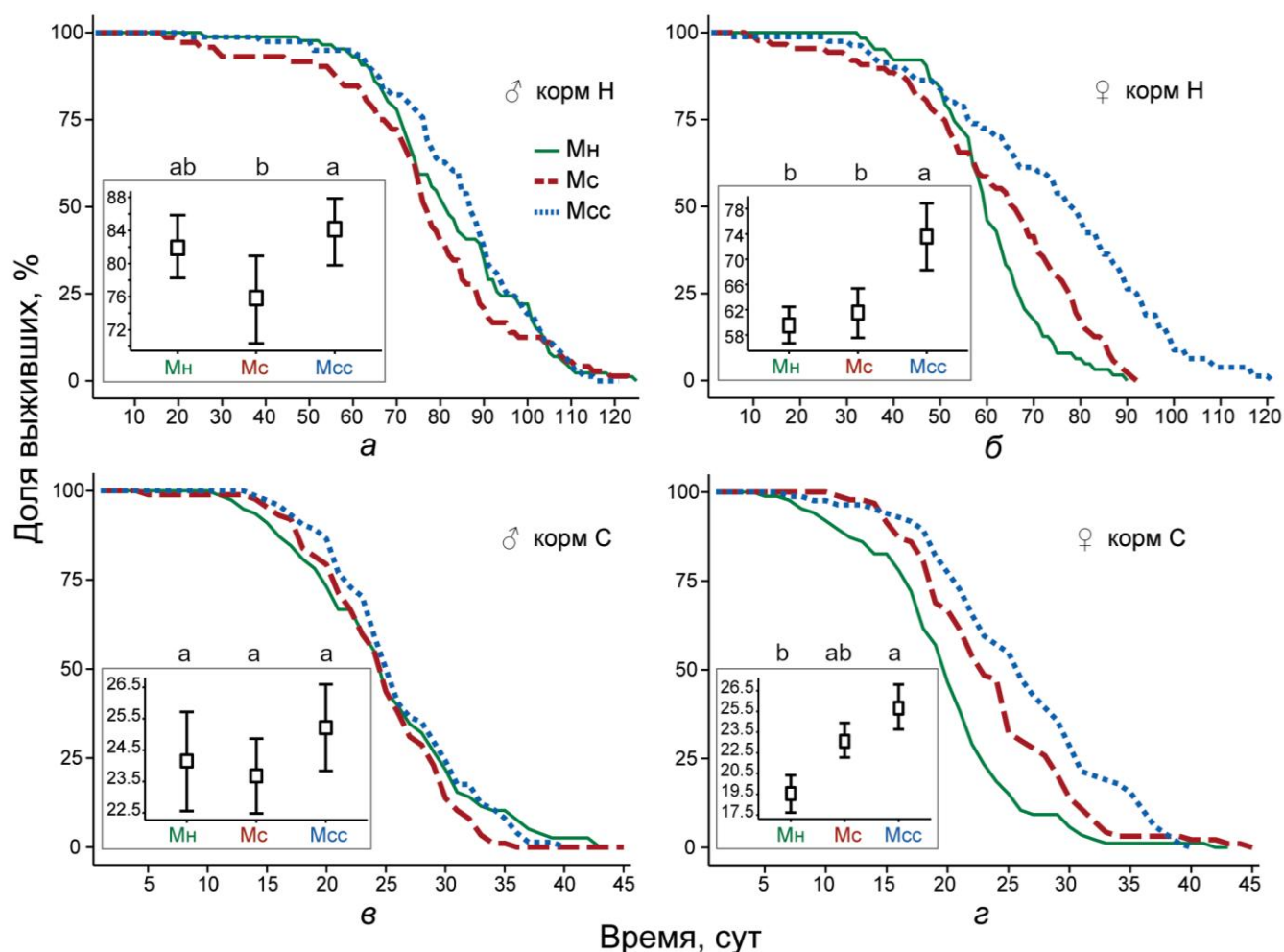


Рисунок 9. Тест 6, гетерогенные условия. Кривые выживания трех экспериментальных линий *D. melanogaster* (Мн, Мс, Мсс) на кормах Н и С (4% соли) и сравнение средних значений продолжительности жизни (ПЖ) (N: 149, 159, 158; 164, 180, 158 соответственно). Основной график: кривые выживания самцов (а, в) и самок (б, г) на кормах Н (а, б) и С (в, г). По горизонтальной оси – возраст когорты в сутках, по вертикальной – доля выживших мух, %. Графики на врезках: средняя ПЖ (сут) и её 95%-ный доверительный интервал, построенный методом бутстрэппинга; по горизонтальной оси – линия мух. Различные буквы над значениями ПЖ означают значимые различия на 5%-ном уровне значимости согласно тесту Тьюки.

Самцы Мсс на корме Н прожили в среднем 84,2 сут, что значимо больше, чем средняя ПЖ самцов Мс (75,8 сут), и статистически неразлично по сравнению со средней ПЖ самцов Мн (81,9 сут) (рис. 9, а). Самцы Мсс на корме С прожили 25,2

сут, самцы Мн 24,2 сут, а самцы Мс 23,7 сут, разница по ПЖ не достигает уровня статистической значимости между линиями (рис. 9, в).

Таким образом, мухи Мсс, культивируемые в гетерогенных условиях (в боксе с двумя отсеками и возможностью выбора между соленым и крахмальным кормами), живут на кормах Н и С по крайней мере не меньше, а в половине случаев значимо дольше, чем мухи, культивируемые в гомогенных условиях на благоприятном корме Н или стрессовом корме С без возможности выбора (Горшкова и др., 2018).

2.3. Возрастная динамика плодовитости самок (Тест 7, гетерогенные условия)

Плодовитость оценивалась по числу яиц, отложенных на свежий корм в течение часа (для корма Н) или в течение суток (для корма С) в расчете на одну самку.

Возрастная динамика плодовитости самок из линий Мн, Мс и Мсс, тестируемых на корме Н, отражена на рис. 10, а. График показывает, что самки Мн и Мс характеризуются высокой плодовитостью в молодом возрасте (максимальная плодовитость отмечается в возрасте около 3 нед) и последующим быстрым ее снижением (репродуктивным старением). Самки Мсс, напротив, характеризуются низкой плодовитостью в молодости и медленным ее снижением с возрастом.

Данную тенденцию можно количественно охарактеризовать, рассчитав средний возраст самки, откладывающей яйца (СВС). Для линий Мн и Мс эта величина составляет 25,0 и 25,7 сут соответственно (различия статистически не значимы). Для линии Мсс она примерно на 40% больше и составляет 35,8 сут. Различия статистически значимы на 5%-ном уровне значимости по сравнению с линиями Мн и Мс. Иными словами, репродукция в линии Мсс смещена на более поздний возраст, а репродуктивное старение замедлено по сравнению с линиями Мн и Мс.

Суммарный коэффициент плодовитости (СКП) самок Мсс на корме Н составляет 29,9 яиц, что значимо больше, чем у самок Мн (27,6) и Мс (23,3).

Колебания плодовитости в линии Мсс на корме Н (на рис. 10, а заметны локальные пики плодовитости в возрасте около 55 и 70 дней) скорее всего отражают колебания неконтролируемых факторов среды, которые сильнее влияли на плодовитость самок Мсс, чем на самок других линий, потому что самки Мсс в целом дольше жили и размножались. С другой стороны, можно предположить, что дополнительные пики плодовитости в позднем возрасте в линии Мсс связаны с изначальной гетерогенностью когорты. Например, поздний пик может быть обусловлен избирательной гибелью особей, сочетавших низкую жизнеспособность с низкой поздней плодовитостью, после чего в когорте остались лишь долгоживущие особи с замедленным репродуктивным старением. Для проверки этого предположения необходимы дополнительные исследования.

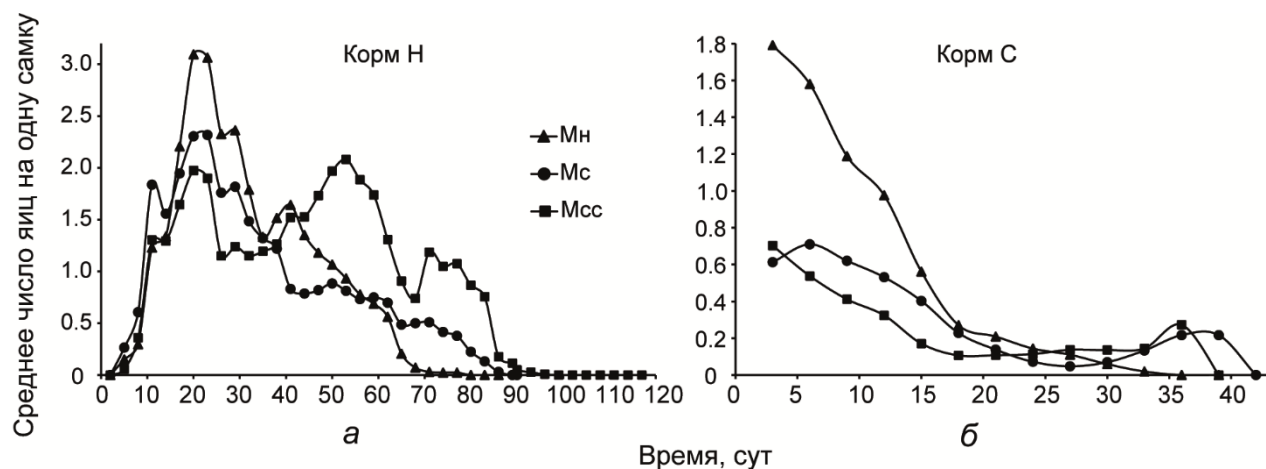


Рисунок 10. Тест 7, гетерогенные условия. Возрастная динамика плодовитости самок из линий Мн, Мс и Мсс на кормах Н (а) и С с 4% соли (б). По горизонтальной оси – возраст мух в сутках с момента выхода из куколки, по вертикальной – среднее число яиц в расчете на одну самку. На корме Н подсчет яиц производился через 1 ч после постановки свежего корма, на корме С – через 24 ч. Данные сглажены методом скользящей средней.

Анализ плодовитости мух на корме С оказался затруднен, потому что мухи крайне неохотно откладывают яйца на свежий соленый корм (а на корме, простоявшем в боксе более суток, учет яиц вести практически невозможно из-за

активности вышедших из яиц личинок, хотя в целом очевидно, что на такой «освоенный» корм яиц откладывается больше, чем на свежий). Поэтому общее число учтенных яиц на корме С оказалось значительно меньше, чем на корме Н (720 яиц против 6155). Тем не менее на корме С, по-видимому, прослеживается такая же тенденция: самки Мсс имеют пониженную плодовитость в молодости и менее выраженное снижение плодовитости с возрастом (замедленное репродуктивное старение) по сравнению с самками Мн и Мс (рис. 10, б). Этот вывод подтверждается значениями СВС: для мух из линии Мсс СВС составляет 10,0 сут, что на 5% уровне значимости достоверно выше, чем для мух Мс (7,9 сут) и Мн (6,2 сут). Эти результаты, как и приведенные выше данные по эффективности размножения и ПЖ, свидетельствуют в пользу повышенной приспособленности мух, культивируемых в пространственно гетерогенной среде (Мсс), к неблагоприятному корму С. С другой стороны, в отличие от результатов на корме Н, где мухи Мсс откладывают в среднем за жизнь больше яиц, чем мухи Мс и Мн, на корме С у мух Мсс величина СКП составляет лишь 1,8 яиц, и это значимо ниже, чем у мух Мс (2,4) и Мн (4,1) (Горшкова и др., 2018).

3. Оценка влияния дрожжевой микробиоты на продолжительность жизни и динамику плодовитости дрозофил⁵

3.1. Предварительный посев (Тест 8)

Посевы мух из линий Мн и Мбд на дрожжевую микробиоту перед началом тестирования на ПЖ и плодовитость носили качественный характер. Основная задача данного посева состояла в том, чтобы убедиться, что у контрольной линии Мн дрожжевая микробиота присутствует, а с мух Мбд, содержащихся продолжительное время на корме с фунгистатическим препаратом, дрожжевая микробиота не высевается.

⁵ Результаты, изложенные в настоящем параграфе, опубликованы в следующей научной статье автора: Яковлева Е.Ю., Максимова И.А., Мерзликин Д.С., Качалкин А.В., Марков А.В. Влияние разных видов дрожжей на продолжительность жизни и плодовитость *Drosophila melanogaster* // Журнал общей биологии. — 2024. — Т. 85, № 3. — С. 165–186. DOI: 10.31857/S0044459624030013, EDN: VDKRHE

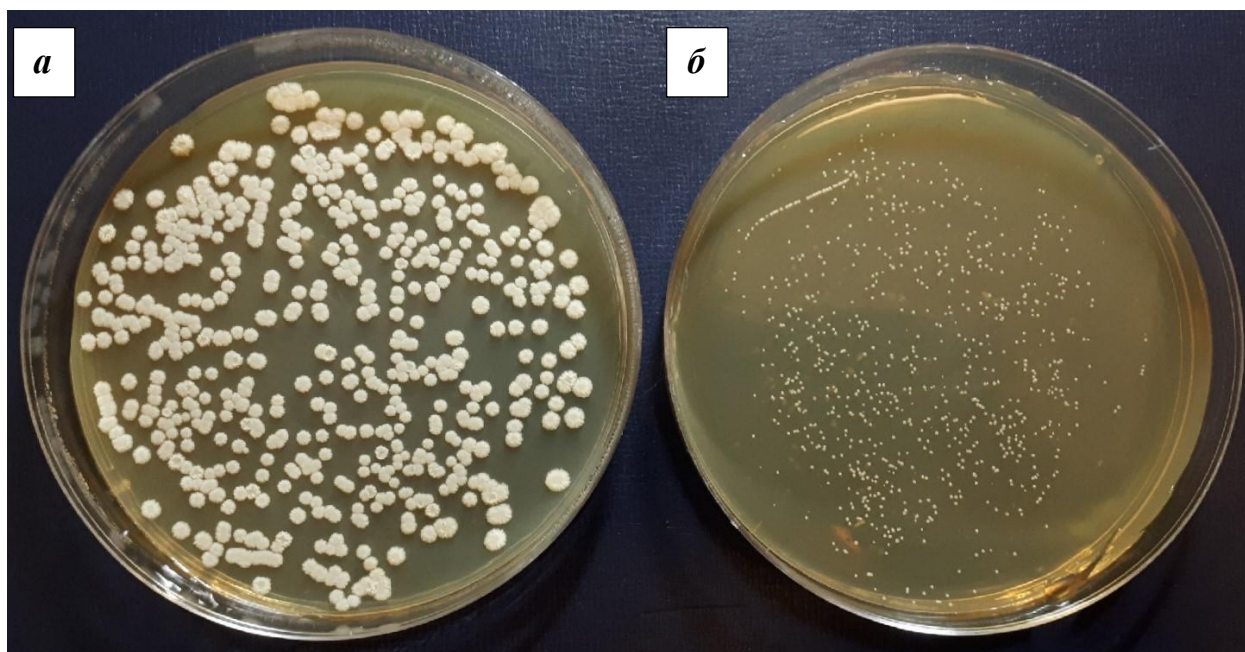


Рисунок 11. Тест 8. Пример предварительного посева гомогената мух из линии Мн (а) и линии Мбд (б) перед началом тестирования.

Данная гипотеза подтвердилась. На рис. 11, а представлен пример посева гомогената мух Мн, на котором обнаружено большое количество дрожжей. Впоследствии, при контрольном посеве (см. ниже Тест 11), дрожжевое сообщество линии Мн, живущей на корме на Н, было определено – оно полностью состоит из типичного для дрозофил вида *Pichia occidentalis*. На рис. 11, б для сравнения приведен пример посева мух Мбд, на нем обнаружены только колонии бактерий, устойчивых к используемой в работе концентрации левомецетина. Результат воспроизвелся во всех повторностях посева.

3.2. Продолжительность жизни (Тест 9)

Согласно двухфакторному дисперсионному анализу и линия (Мн или Мбд) ($p < 0,0001$), и тип корма (Н или Н, засеянный одним из трех видов дрожжей) ($p < 0,0001$) и взаимодействие этих факторов ($p = 0,0069$) значимо влияют на среднюю ПЖ. Значимое влияние не только линии и типа корма, но и их соотношения означает, что есть виды дрожжей, которые влияют на среднюю ПЖ по-разному в разных линиях дрозофил.

Для начала приведем результаты средней ПЖ дрозофил во всех вариантах теста без разделения по полу (рис. 12, а, табл. 2). Мухи Мбд, с обедненным дрожжевой микробиотой, тестируемые на корме без подсева дрожжей (Н), живут значительно дольше, чем мухи во всех остальных вариантах теста. Мухи Мбд на Н прожили в среднем более 78 дней, тогда как мухи Мн, имеющие свою естественную микробиоту, на том же корме прожили меньше почти на 14 дней – только 64,3 дня (различия статистически значимы).

В линии Мбд любой вид подсеянных на корм дрожжей значительно понижает среднюю ПЖ примерно до уровня средней ПЖ контрольных мух (Мн на Н). На корме S.b ПЖ мух Мбд значительно снижается почти на 14 дней, с 78,1 дня до 64,2 дня (Мбд на S.b по сравнению с Мбд на Н). При этом «добавление» своей естественной микробиоты значительно снижает среднюю ПЖ еще почти на 7 дней, с 64,2 дня до 57,4 дня (Мн на S.b по сравнению с Мбд на S.b, различия статистически значимы). ПЖ мух Мбд на корме с подсевом пекарских дрожжей (S.c) значительно снижается более чем на 15 дней (Мбд на S.c по сравнению с Мбд на Н), а добавление еще и естественной микробиоты значительно сокращает жизнь на 7 дней дополнительно (Мн на S.c по сравнению с Мбд на S.c, различия статистически значимы). Средняя ПЖ мух Мбд на корме Z.b значительно снижается примерно на 13 дней (Мбд на Z.b по сравнению с Мбд на Н), а добавление к подсеvu дрожжей естественной микробиоты мух сокращает жизнь еще примерно на 4 дня, однако различие средней ПЖ не достигает уровня статистической значимости (Мн на Z.b по сравнению с Мбд на Z.b).

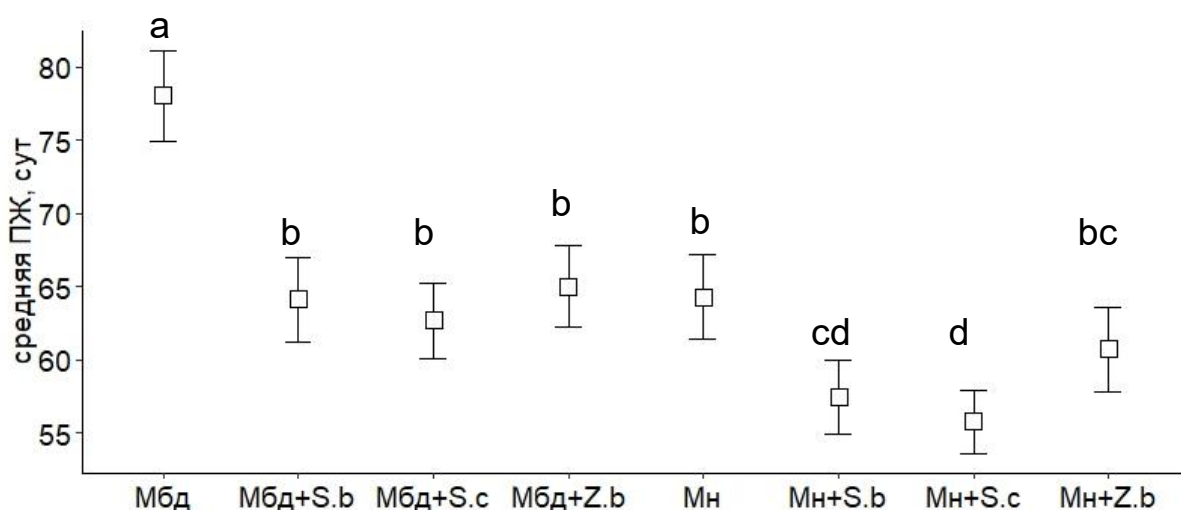
Подсев дрожжей влияет на ПЖ самцов и самок не одинаково (рис. 12, б, в, 12, табл. 2). Согласно дисперсионному анализу и корм, и линия, и взаимодействие факторов значительно влияют на среднюю ПЖ самцов ($p < 1 \times 10^{-5}$). Самцы Мбд на Н прожили в среднем 83,9 дней, что значительно дольше, чем самцы во всех остальных вариантах теста. В линии Мбд снижение ПЖ самцов, как и снижение ПЖ обоеполой когорты, не зависит от вида дрожжей, посеянных на корм. Самцы Мбд на корме с подсевом любого из трех видов дрожжей живут в среднем столько же,

сколько самцы Мн на Н. Но снижение средней ПЖ самцов, вызванное подсевом какого-либо из видов дрожжей на корм, выражено сильнее, чем по обоим половым когорте в целом: самцы Мбд на Н живут на 19,4–22,9 дня дольше, чем самцы Мбд на корме с подсевом или самцы Мн на Н, тогда как по когорте в целом это снижение составило лишь 13,9–15,3 дней (рис. 12, б, 13, а, б, табл. 2). Иными словами, подсев дрожжей сокращает жизнь самцов Мбд сильнее, чем самок.

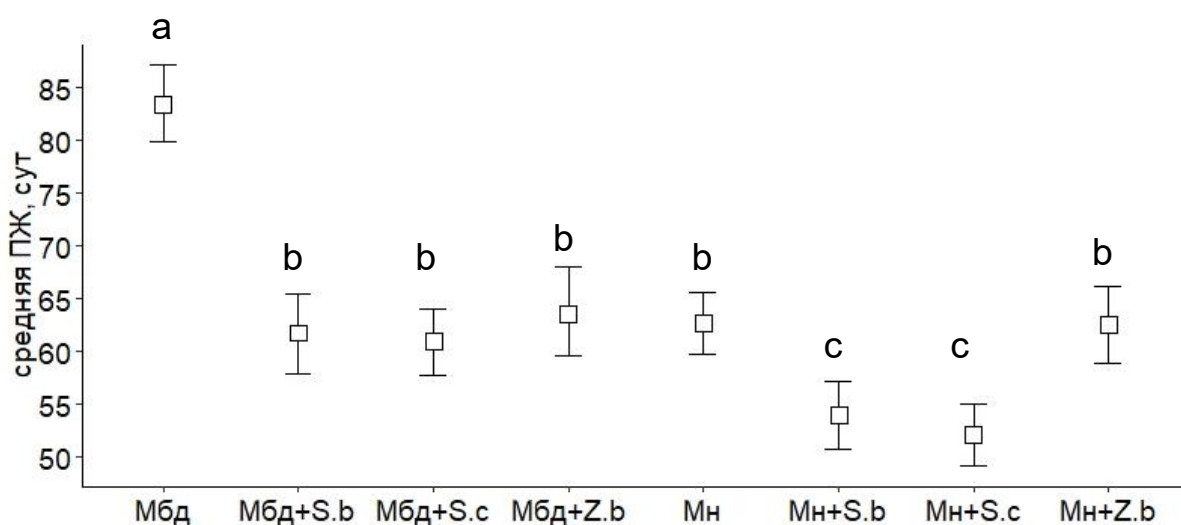
В линии Мн средняя ПЖ самцов снизилась только на корме с подсевами дрожжей, не характерных для мух, культивируемых на стандартном корме, то есть *S. bacillaris* и *S. cerevisiae*. Причем средняя ПЖ самцов Мн на кормах S.b и S.c сократилась сильнее, чем для когорты в целом, на 8,7 и 10,6 дней против 6,9 и 8,5 дней соответственно. Самцы Мн на Н и Z.b имеют примерно одинаковую среднюю ПЖ (62,7 и 62,6 дней соответственно, различия статистически не значимы).

Согласно дисперсионному анализу линия и корм значимо влияют на среднюю ПЖ самок ($p < 0,0014$), но взаимодействие факторов незначимо ($p = 0,9400$). Это означает, что подсев дрожжей на корм влияет на самок обеих линий мух сходным образом. Самки Мбд на корме Н живут в среднем на 6–13,9 дней дольше, чем самки во всех прочих вариантах теста (различия по средней ПЖ статистически значимы) (рис. 12, в, 13, в, г, табл. 2). При этом самки Мбд на Н живут лишь на 6,7 дня дольше, чем самки Мн на Н, тогда как для когорты эта разница составляет 13,8 дней, а для самцов 21,2 дня. Статистически значимых различий по средней ПЖ самок во всех остальных вариантах теста обнаружить не удалось. Несмотря на это, наблюдается тенденция к более сильному снижению ПЖ самок при подсеве дрожжей на корм в дополнение к естественной микробиоте мух Мн. Для самцов и когорты в целом ПЖ мух Мн на корме с подсевом *S. bacillaris* и *S. cerevisiae* значимо ниже, чем во всех остальных вариантах теста.

a



б



в

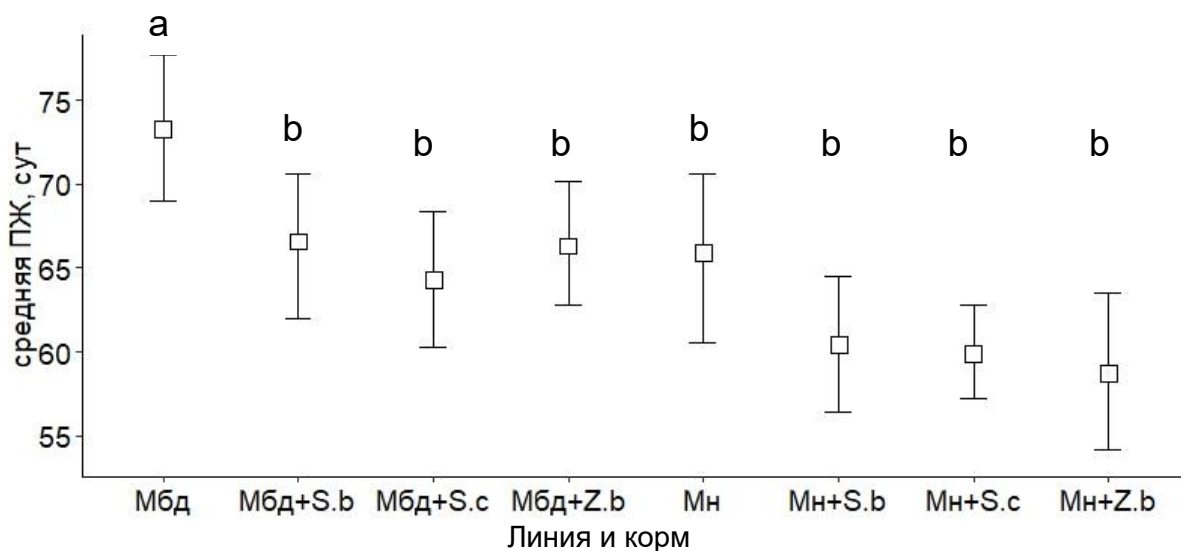


Рисунок 12. Тест 9. Средняя ПЖ (сут) мух *a*) обоих полов, *б*) самцов, *в*) самок линий Мбд и Мн на корме Н без подсева или на корме Н с подсевом дрожжей S.b – *S. bacillaris*, S.c – *S. cerevisiae*, Z.b – *Z. bailii* (N: 126, 119, 118, 121; 114, 122, 116, 120). 95%-ый доверительный интервал, построенный методом бутстрэппинга. Различные буквы означают значимые различия на 5%-ном уровне значимости.

Таблица 2. Тест 9. Характеристики ПЖ мух Мбд и Мн на корме с подсевами различных видов дрожжей

Линия	Мбд				Мн			
Подсев*	нет	S.b	S.c	Z.b	нет	S.b	S.c	Z.b
Муши без разделения по полу								
Число особей	126	119	118	121	114	122	116	120
Средняя ПЖ, сут	78,1	64,2	62,8	65,1	64,3	57,4	55,8	60,8
Медианная ПЖ, сут	80,0	66,0	62,5	64,0	65,5	57,0	57,0	61,5
Стандартное отклонение	17,2	16,1	14,7	15,9	16,1	15,3	11,9	16,8
КВ, %	22,3	25,1	23,4	24,5	25,0	26,7	21,3	27,6
ККВ, %	17,2	14,4	18,2	15,6	18,1	21,1	12,5	19,7
Самцы								
Число самцов	61	59	55	58	57	57	60	65
Средняя ПЖ, сут	83,9	61,8	61,0	64,5	62,7	54,0	52,1	62,6
Медианная ПЖ, сут	84,0	61,0	61,0	63,0	63,0	53,0	56,0	62,0
Стандартное отклонение	15,6	14,7	12,6	17,9	11,8	12,6	12,1	14,8
КВ, %	18,6	23,8	20,7	27,8	18,9	23,4	23,2	23,7
ККВ, %	11,9	11,1	14,8	16,7	15,1	18,9	14,3	17,7
Самки								
Число самок	65	60	63	63	57	65	56	55
Средняя ПЖ, сут	72,6	66,6	64,3	65,6	65,9	60,4	59,9	58,7
Медианная ПЖ, сут	73,0	69,0	69,0	66,0	69,0	60,0	59,5	60,0
Стандартное отклонение	17,4	17,2	16,2	14,0	19,4	16,9	10,4	18,7
КВ, %	24,0	25,8	25,2	21,3	29,4	28,0	17,3	31,9
ККВ, %	15,8	13,8	16,3	11,0	21,7	22,5	13,7	21,3

* S.b, Z.b, S.c – подсев дрожжей видов *S. bacillaris*, *Z. bailii* и *S. cerevisiae* на корм Н соответственно

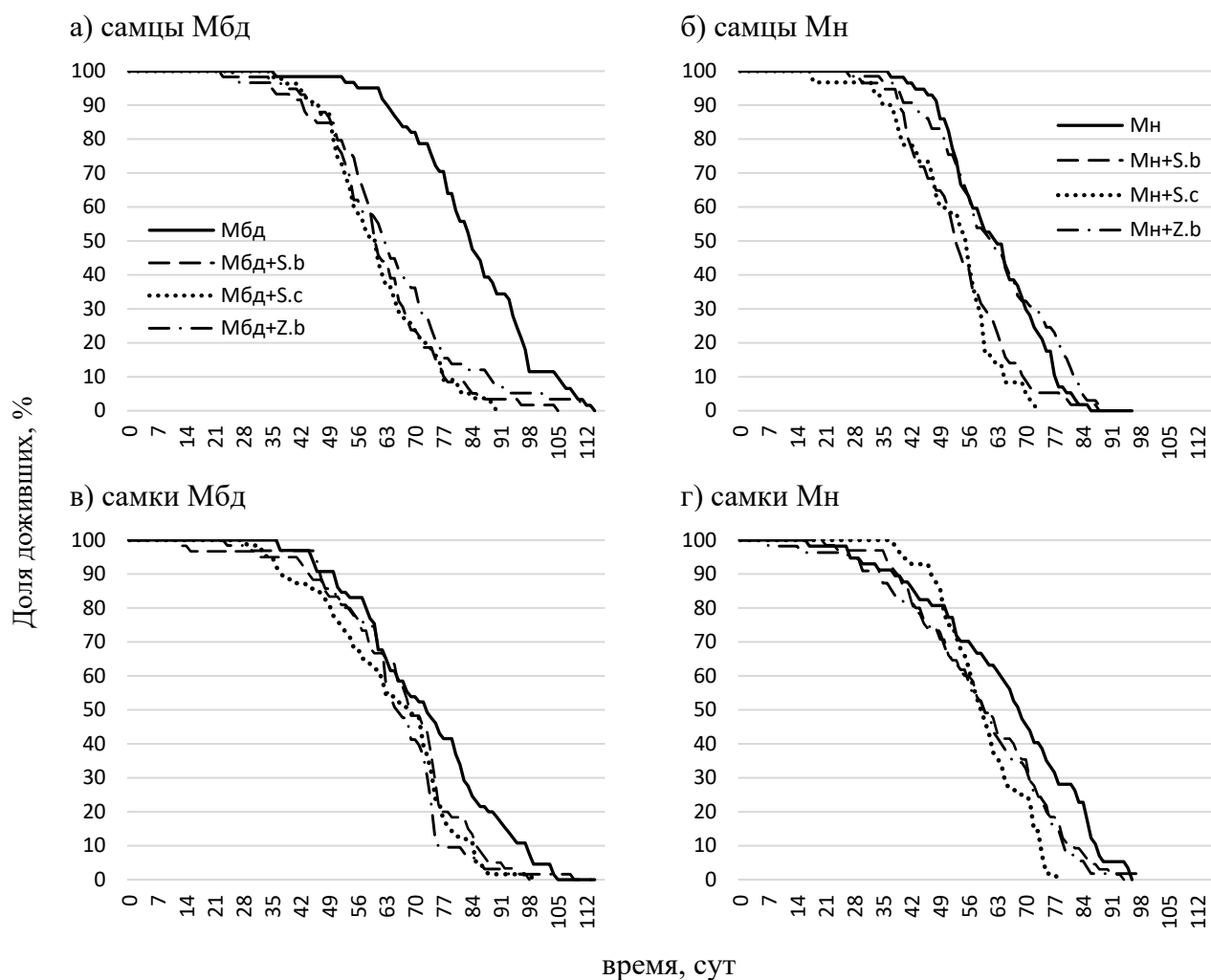


Рисунок 13. Тест 9. Кривые выживания экспериментальных линий: *а* – самцы МбД, *б* – самцы Мн, *в* – самки МбД, *г* – самки Мн. По горизонтальной оси – возраст когорты в сутках, по вертикальной – доля выживших мух, %. Обозначения подсевов аналогичны рис. 12. Численность особей (N) см. в табл. 2.

Чтобы проверить есть ли различие в эффекте подсева на ПЖ в зависимости от пола, мы пронормировали ПЖ самок и самцов во всех вариантах теста с подсевом дрожжей на «базовую» ПЖ, то есть ПЖ самок и самцов соответствующих линий, тестируемых на корме Н без подсева. Согласно дисперсионному анализу на 5% уровне значимости значимыми оказались переменные подсева ($p = 0,0194$), линии ($p = 1,25 \times 10^{-6}$) и пола ($p = 7,04 \times 10^{-7}$), а также взаимодействие переменных подсев и пол ($p = 0,0219$) и линии и пол ($p = 6,92 \times 10^{-6}$), это означает, что в разных линиях и при разных подсевах ПЖ меняется по-разному в зависимости от пола.

Благодаря поправке на множественность сравнений Ньюмена–Кейлса

удалось подтвердить описанные выше наблюдения: средняя ПЖ самцов из линии Мбд снижается при всех видах подсева значительно сильнее, чем средняя ПЖ самок. Для линии Мн влияние подсева дрожжей *S. bacillaris* и *S. cerevisiae* на ПЖ самцов и самок значимо не различается, а при подсеве дрожжей *Z. bailii* средняя ПЖ самцов снижается не так сильно, как средняя ПЖ самок.

3.3. Возрастная динамика плодовитости самок (Тест 10).

Плодовитость мух оценивалась по числу яиц, отложенных на свежий корм в течение часа. Сопоставление плодовитости в расчете на одну самку на корме с различными подсевами представлено на рис. 14. В табл. 3 приведены расчеты среднего возраста самки, откладывающей яйца (СВС), и суммарного коэффициента плодовитости (СКП).

На рис. 14 видно, что дрожжи, как подсеянные, так и присутствующие в естественной микробиоте, усиливают интенсивность откладки яиц. Самая низкая плодовитость наблюдается у самок из линии Мбд, тестируемых на корме без подсева дрожжей, причем пик заметно сдвинут на поздний возраст, тогда как в других вариантах теста к этому времени уже шел спад плодовитости. Это наглядно характеризуется самым низким из восьми вариантов значением СКП, согласно которому за всю жизнь самка Мбд на Н отложила на свежий корм (в течение первого часа после помещения корма в бокс) в среднем чуть больше 9 яиц, и самым высоким средним возрастом откладки яиц (СВС), равным 40,2 дня (табл. 3). Этот возраст как раз примерно совпадает с пиком плодовитости на графике (рис. 14). Кроме того, самки в этом варианте теста не только прожили дольше всех, но и дольше всех откладывали яйца на свежий корм (замедленное репродуктивное старение). При этом подсев дрожжей сильнее влияет на плодовитость мух Мбд и сглаживает различия между линиями. Кроме того, подсев дрожжей на корм «возвращает» пик репродукции самок Мбд на более ранний возраст, примерно такой же, как у Мн (табл. 3, СВС).

Таблица 3. Тест 10. Средний возраст самки, откладывающей яйца, (СВС) и суммарный коэффициент плодовитости (СКП)

Линия*	Мбд				Мн			
Подсев***	нет	S.b	S.c	Z.b	нет	S.b	S.c	Z.b
СВС, сут	40,2**	29,6	27,5	30,2	34,2	28,1	22,2	30,8
СКП	9,2	55,3	44,6	60,7	29,3	56,1	25,6	47,6

* Численность самок (N) см. в табл. 2.

** Жирным шрифтом выделены максимальное и минимальное значения СВС и СКП

*** Обозначения подсевок аналогично таблице 2

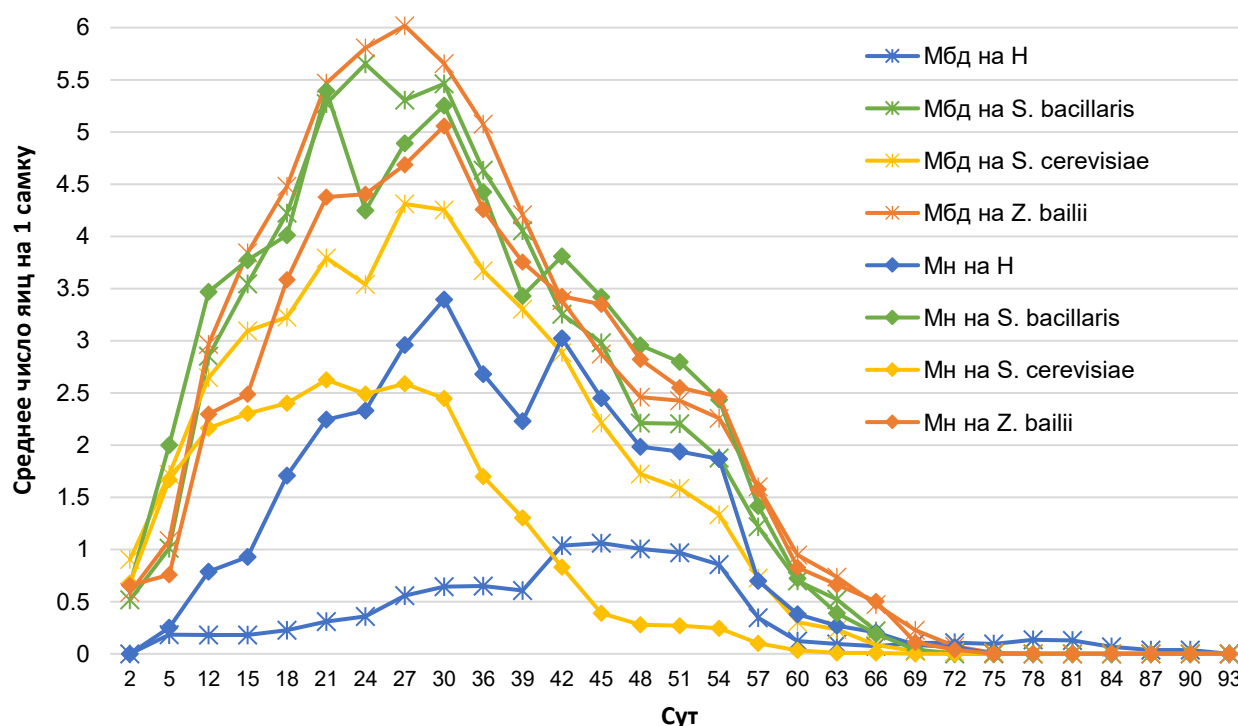


Рисунок 14. Тест 10. Возрастная динамика плодовитости самок из линий Мбд и Мн на корме Н или том же корме с подсевом одного из трех видов дрожжей. По горизонтальной оси – возраст мух в сутках с момента выхода из куколки, по вертикальной – среднее число яиц в расчете на одну самку. Подсчет яиц производился через 1 ч после постановки свежего корма. Данные сглажены методом скользящей средней. Обозначения подсевок аналогичны рис. 12.

Об этом же свидетельствуют результаты дисперсионного анализа: тип корма значительно влияет на среднюю абсолютную плодовитость самок ($p < 0,0007$), в

отличие от линии мух ($p = 0,5641$) или взаимодействия факторов ($p = 0,3590$). Согласно критерию Ньюмена–Кейлса средняя абсолютная плодовитость в варианте теста Мбд на Н значимо ниже, чем во всех остальных вариантах теста. При этом во всех остальных вариантах теста, то есть как в присутствии естественной микробиоты, подсева дрожжей на корм или двух этих факторов вместе, средняя плодовитость самок не различается значимо.

В то же время анализ лишь средней плодовитости не позволяет сопоставлять плодовитость в динамике, а согласно рис. 14 наблюдаются существенные различия в динамике откладки яиц в обеих линиях и на разных типах корма.

Суммарная плодовитость на корме с подсевом дрожжей *S. bacillaris* в обеих линиях сопоставима: СКП 55,3 и 56,1 яиц соответственно, а СВС составил 29,6 и 28,1 дней в линиях Мбд и Мн соответственно. На корме с подсевом пекарских дрожжей СВС мух обеих линий низкая (а у мух Мн она минимальна по сравнению с остальными вариантами теста), а суммарная плодовитость самок Мбд выше, чем самок Мн: 44,6 яиц против 25,6 яиц. На корме с дрожжами *Z. bailii* СВС в двух линиях сопоставима, а суммарная плодовитость самок Мбд снова существенно выше, чем самок Мн: и 60,7 против 47,6 яиц. Кроме того, суммарный коэффициент плодовитости мух Мбд на этом виде дрожжей максимален по сравнению со остальными вариантами теста.

Таким образом, в линии Мн плодовитость на корме Н примерно сопоставима с плодовитостью на корме с пекарскими дрожжами, при этом подсев пекарских дрожжей существенно сдвинул репродукцию самок Мн на более ранний возраст. Примерно после десятидневного возраста плодовитость мух Мн на корме с дрожжами *Z. bailii* (напомним, что они встречаются у дрозофил, культивируемых на стандартном корме) сопоставима с плодовитостью на корме с подсевом дрожжей *S. bacillaris* (не встречающихся в микробиоме мух, культивируемых на стандартном корме, но характерных для линий, живущих на соленом корме), и значительно выше, чем при тестировании на корме Н без подсева и корме с пекарскими дрожжами (которые для микробиоты дрозофил нетипичны вообще) (рис. 14, линии с ромбами). На плодовитость самок Мбд подсевы разных видов дрожжей

действуют примерно так же, как на Мн (о чем свидетельствует незначимость переменной «линия» и рис. 14). Примерно после десятидневного возраста плодовитость самок на корме с пекарскими дрожжами меньше, чем на корм с двумя другими подсевами, тогда как плодовитости на корме с дрожжами *Z. bailii* и *S. bacillaris* примерно сопоставимы (рис. 14, линии со звездочками).

3.4. Состав и структура дрожжевой микробиоты, развивающейся на корме (Тест 11)

Для оценки состава микробиоты, развивающейся в боксах, через семь недель после начала теста был проведен посев корма, освоенного мухами в течение трех дней (рис. 15, фотографии типичных чашек Петри с посевами представлены в Приложении). В результате проведения этих посевов удалось узнать следующее о микробиоте тестируемых когорт:

1) Для мух из линии Мн характерны дрожжи вида *P. occidentalis*. В линии Мн во всех вариантах теста этот вид дрожжей стабильно высевается (рис. 15, а, б, г, е).

2) Во всех пробах обнаруживается тот вид дрожжей, который был засеян на корм исследователем.

3) Ни один из трех видов дрожжей, подсевавшихся на корм искусственно (*S. bacillaris*, *S. cerevisiae*, *Z. bailii*), не был высеян из тех боксов, где мухи не тестировались на корме с подсевом данного вида дрожжей. Это свидетельствует об отсутствии случайной контаминации путем переноса микробиоты из одного бокса для тестирования в другой.

4) На корме из бокса «Мбд на Н» не было обнаружено никакой дрожжевой микробиоты, поэтому данный вариант посева не представлен на рис. 15 (однако была обнаружена устойчивая к левомецетину бактериальная микробиота, анализ которой выходит за рамки данного исследования). Данный результат совпадает с результатами предварительного посева – в посевах гомогената мух линии Мбд перед началом теста не было обнаружено никакой дрожжевой микробиоты (рис. 11, б). Это свидетельствует об отсутствии случайного загрязнения боксов с мухами Мбд микробиотой из других боксов.

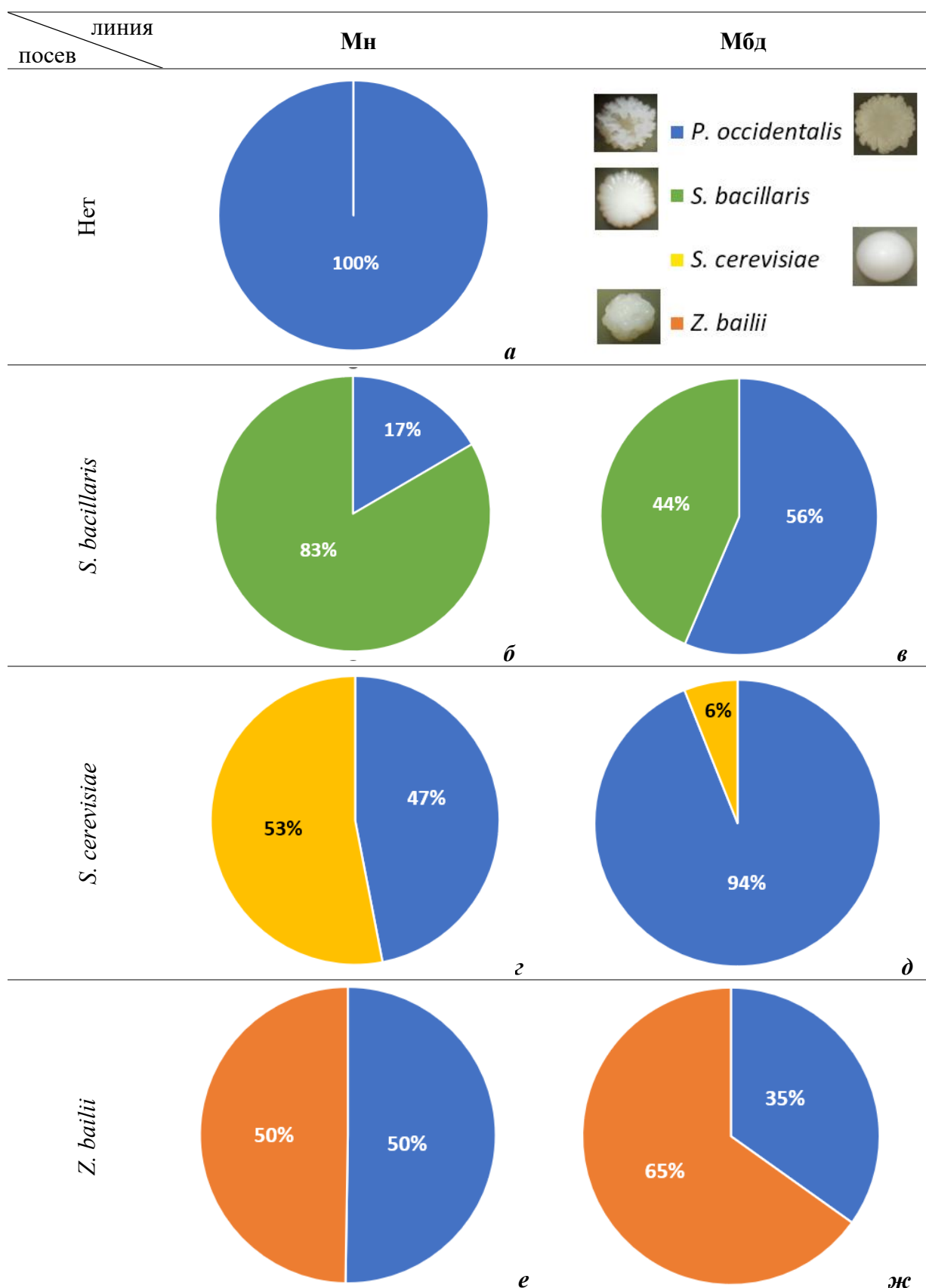


Рисунок 15. Тест 11. Структура дрожжевой микробиоты, развившейся на трехдневном корме в тех вариантах Теста 10, где она была обнаружена. В долях колониеобразующих единиц (КОЕ) каждого вида дрожжей от общего количества КОЕ дрожжей, обнаруженных в посевах.

5) Во всех вариантах теста с участием мух Мбд и какого-либо из подсево́в дрожжей обнаружены дрожжи *P. occidentalis*, характерные для линии Мн, предковой к линии Мбд (рис. 15, в, д, ж). В обсуждении мы рассмотрим гипотезы, объясняющие, по какой причине может быть получен столь интересный и неожиданный результат.

В ходе данного контрольного посе́ва исследовался также корм из бокса, не содержащего мух (центральный квадрат на рис. 2). На данном корме, простоявшем в боксе три дня, никакой микробиоты не было обнаружено. Для отслеживания возможной контаминации в чистые боксы, не содержащие мух, на три дня ставились чашки Петри с кормом Н, засеянным каждым из видов дрожжей, используемых в тесте. Контрольный посев этого корма выявил только те дрожжи, которые были засеяны на него изначально, никакая другая микробиота за три дня на них не развивалась, что свидетельствует о герметичности боксов для тестирования и низкой вероятности контаминации теста дрожжами извне.

4. Факторы, вносящие вклад в увеличение продолжительности жизни дрозофил, отбираемых на позднее размножение⁶

4.1. Продолжительность жизни в когортах мух линии Ма, отбираемой на позднее размножение

Линия мух Ма произошла от контрольной линии Мн (поколение 0 на рис. 16) путем отбора на позднюю репродукцию. Линия представляла собой последовательные одновозрастные когорты, в которых мухи размножались в возрасте от 68 до 85 дней. Исключение составило только поколение 3, так как все линии лабораторного эксперимента в это время были подвержены клещевому заражению, что привело к снижению ПЖ мух (красная полоса на рис. 16). Полностью побороть заражение удалось к 5 поколению в линии Ма.

⁶ Результаты, изложенные в настоящем параграфе, опубликованы в следующей научной статье автора: Яковлева Е.Ю., Мерзликин Д.С., Завьялов А.Е., Маслов А.А., Миронова Е.А., Марков А.В. Вклад генов и симбиотической микробиоты в увеличение продолжительности жизни мух *Drosophila melanogaster*, отбираемых на позднее размножение // Журнал общей биологии. — 2022. — Т. 83, № 4. — С. 268–287. DOI: 10.31857/S004445962204008X

Исходно из мух линии Мн была сформирована одновозрастная когорта, ПЖ мух в ней составила 71,9 суток. Оставшиеся в данной когорте мухи были размножены в возрасте 83-85 дней (средний возраст отобранной когорты составил 91,5 суток, $n = 90$, из них 71 самка), их потомки дали начало первому поколению мух линии Ма, средний возраст мух в которой составил 74,8 суток. Если оценить коэффициент наследуемости в узком смысле, то $h^2 = \frac{74,8-71,9}{91,5-71,9} \approx 0,15$. Тогда как согласно дисперсионному анализу, данное увеличение ПЖ оказалось незначимым ($p = 0,1930$), поэтому в данном случае коэффициент наследуемости еще не говорит о реальном увеличении ПЖ в результате отбора.

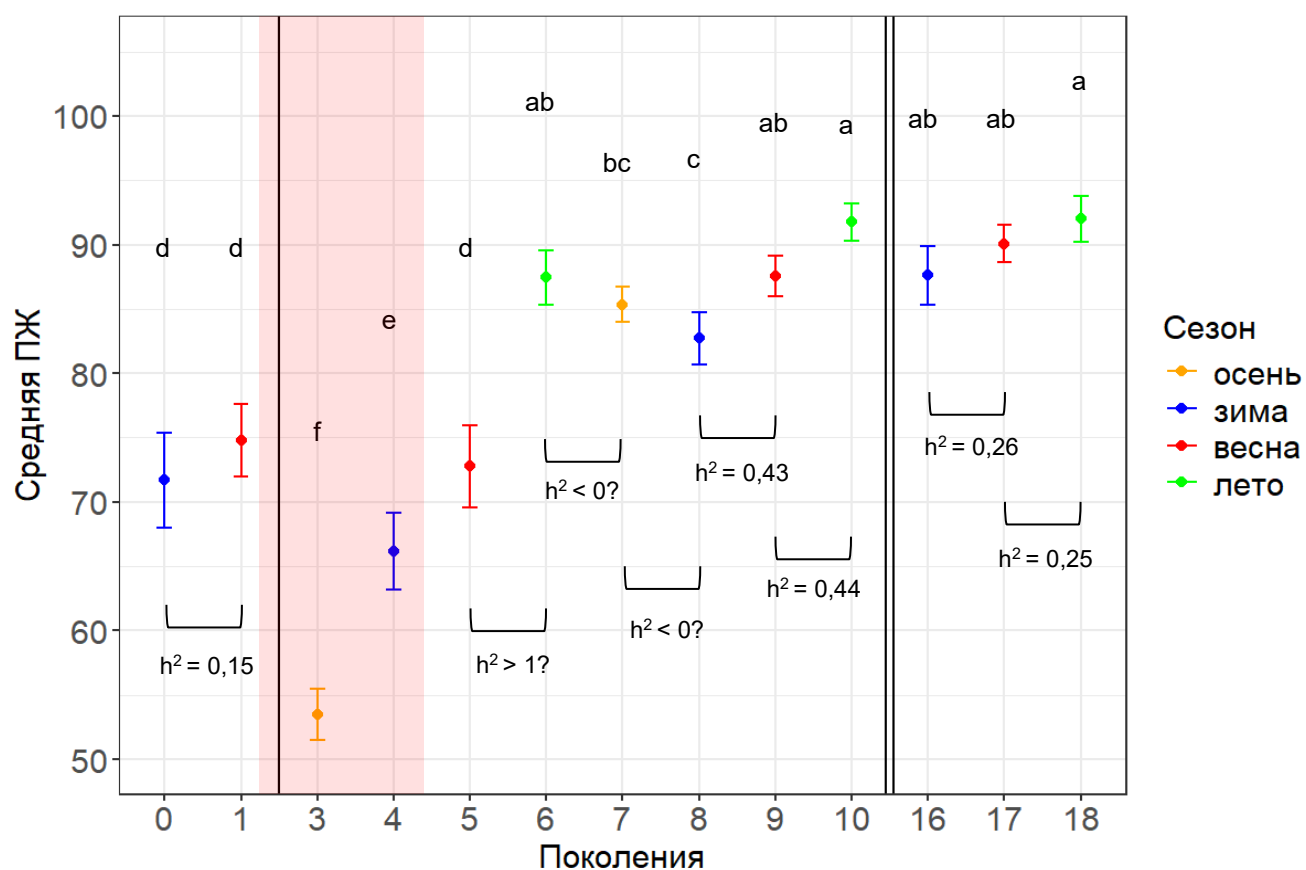


Рисунок 16. Средняя ПЖ (сут) мух *D. melanogaster* линий Ма на корме Н и её 95% доверительный интервал, построенный методом бутстрепинга. Различные буквы означают значимые различия на 5%-ном уровне значимости, согласно дисперсионному анализу и поправке Ньюмена–Кейлса. h^2 – коэффициент наследуемости в узком смысле. Закрашенной областью отмечен период со 2 по 4 поколение, когда линия Ма была подвержена клещевому заражению, что отразилось на ПЖ имаго. Вертикальными линиями помечены поколения 2, 11-15, когда измерение ПЖ мух не проводилось.

Аналогичным образом был рассчитан коэффициент наследуемости для всех смежных поколений линии Ма, не подверженных клещевому заражению (обозначен на рис. 16). Поколение 18 в линии Ма имело среднюю ПЖ, равную 92 суткам, это значимо дольше, чем ПЖ поколений 0 и 1, а также все тестирования ниже (см. Тесты 12-14) однозначно свидетельствуют, что мухи Ма живут значимо дольше мух предковой линии Мн. При этом на рис. 16 видно, что ПЖ испытывает колебания в результате неконтролируемых факторов, которые не нивелируют отчетливый тренд на увеличение ПЖ мух в линии Ма, но и не позволяют напрямую сравнивать ПЖ от поколения к поколению, делая коэффициент h^2 неинформативным, а в ряде случаев и неинтерпретируемым (поколения 5-8 на рис. 16). Последний меняется в широких пределах от 0,15 до 0,44, а также приобретает недопустимые по смыслу показателя значения больше 1 (6 поколение) и меньше 0 (7 и 8 поколения).

Дисперсионный анализ, проведенный для 13 поколений мух линии Ма (всего 5312 особей), обозначенных на рис. 16, показывает, что сезон значимо влияет на ПЖ ($p < 0,001$). Причем мухи дольше всего живут летом, несколько меньше весной, еще меньше осенью и меньше всех зимой (все различия статистически значимы согласно тесту Ньюмена–Кейлса). Это полностью согласуется с тем, что изображено на рис. 16 на непрерывной серии из 6 поколений (от 5 до 10) и 3 поколений (от 16 до 18).

Дисперсионный анализ также показывает, что поколение значимо влияет на ПЖ ($p < 0,001$). Причем согласно тесту Ньюмена–Кейлса можно заключить, что рост ПЖ шел до 9 поколения (заявивших 28 месяцев эксперимента), далее даже с учетом сезонных колебаний ПЖ мух в линии перестала значимо изменяться.

4.2. Сопоставление продолжительности жизни мух в контрольной линии (Мн) и линии, отбираемой на позднее размножение (Ма) (Тест 12)

В табл. 4 и на рис. 17 приведены параметры жизненного цикла когорт мух из линий Мн и Ма (потомки 9-го поколения отбора мух Ма). Медианная ПЖ самок из линии Ма составила 98 сут против 44 сут для самок из линии Мн, для самцов те же показатели составили 93 и 61 сут соответственно. Согласно логранговому тесту различия по ПЖ между линиями значимы как для самцов, так и для самок ($p < 0,001$).

Поскольку мухи из линии Ма произошли от мух из линии Мн путем отбора на позднее размножение, то можно было бы предположить, что значимые различия по ПЖ – результат отбора. Однако длительные наблюдения за ПЖ мух из отбираемой линии Ма (рис. 16), показывает, что увеличение ПЖ мух в линии, находящейся под отбором, нельзя объяснить только генетическими факторами. Следующие тесты призваны прояснить, какие именно факторы повлияли на изменение ПЖ мух в линии Ма.

Таблица 4. Тест 12. Параметры жизненного цикла когорт мух Ма (потомки 9-го поколения) и Мн

Показатель, сут \ пол	♂Ма♀Ма		♂Мн♀Мн	
	♂	♀	♂	♀
Число особей (N)	62	60	59	76
Средняя ПЖ, сут	87,2	92,5	58,0	46,3
Ст. отклон., сут	19,3	23,1	16,2	11,8
КВ, %	22,1	25,0	28,0	25,6
Q1, сут	75	78,5	50,5	38
Медианная ПЖ (Me), сут	93	98	61	44
Q3, сут	101	109,3	71	53
Qmax, сут	108	121	75,2	68,5
ККВ, %	14,0	15,7	16,8	17,0

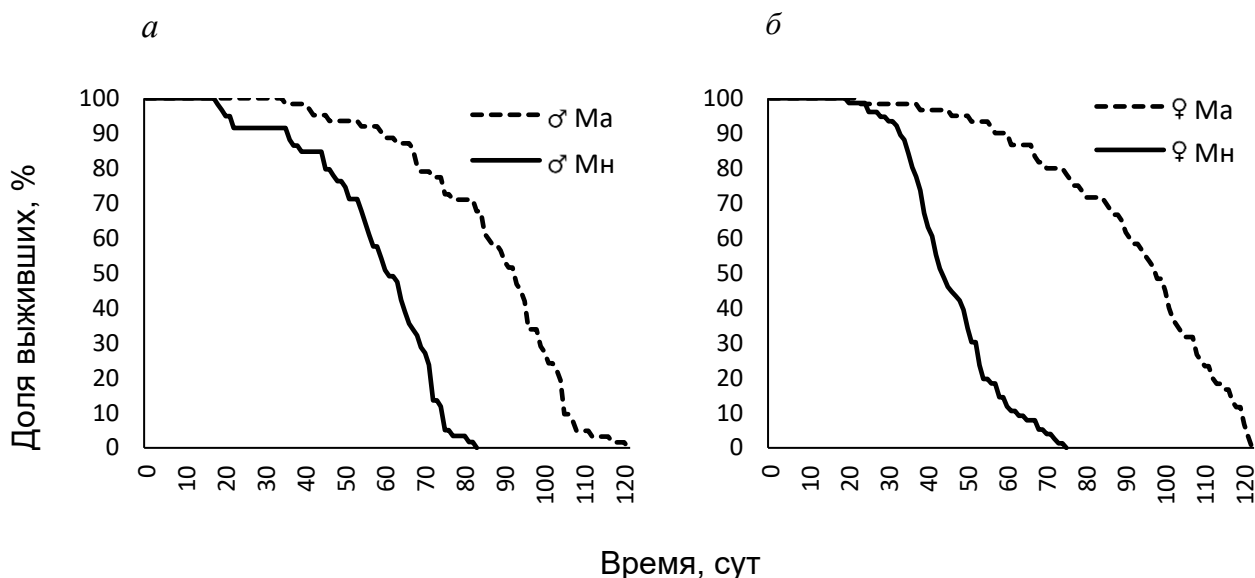


Рисунок 17. Тест 12. Кривые выживания для самцов и самок из линий Ма и Мн (N см. в табл. 4). По вертикальной оси – доля мух в когорте, доживших до определенного дня (в процентах), по горизонтальной оси – возраст мух (с момента выхода из куколки) в сут.

4.3. Оценка продолжительности жизни дрозофил в тестировании на совместное проживание (Тест 13)

В табл. 5 и на рис. 18 приведены параметры жизненного цикла когорт мух из линий Мн и Ма, живших с партнерами из своей линии или из чужой для них обеих линии Мбд. В табл. 6 представлены попарные сравнения ПЖ дрозофил из различных вариантов теста.

У мух из линии Мн в зависимости от пола и партнеров медианная ПЖ составила от 40 до 46 сут, у мух Ма – от 93 до 114 сут. Таким образом, мухи из линии Ма прожили в 2–2,5 раза дольше мух из линии Мн, являющейся для них предковой (табл. 5; табл. 6, сравнения 1–2). Данный результат согласуется с результатами Теста 12 (табл. 4). Заметим, что количественное сопоставление значений ПЖ мух в тестах, проведенных в разное время, не вполне корректно, так как на ПЖ мух могут влиять неконтролируемые абиотические факторы (например, атмосферное давление, сезон), эффект которых нивелируется только при одновременном тестировании.

Таблица 5. Тест 13. Параметры жизненного цикла двенадцати когорт мух, тестируемых на совместное проживание

Показатель, сут \ пол	♂Мн♀Мн		♂Мн♀Мбд		♂Мбд♀Мн		♂Ма♀Ма		♂Ма♀Мбд		♂Мбд♀Ма	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Число особ.	75	101	64	86	86	92	80	98	77	83	75	93
Сред. ПЖ, сут	50,8	47,0	51,3	54,7	39,8	39,1	103,9	106,1	109,0	97,6	87,8	95,8
Ст. отклон., сут	24,2	17,2	22,2	18,7	9,7	8,4	24,8	29,1	17,2	20,9	20,0	26,4
КВ, %	47,6	36,6	43,2	34,1	24,3	21,4	23,8	27,4	15,8	21,5	22,8	27,6
Q1, сут	37,5	38	37,75	45	36	35	94,5	91,5	100	85,5	75,5	77
Мед. ПЖ (Ме), сут	44	44	46	53	40	40	109	114	113	100	88	93
Q3, сут	60,5	55	66,5	63,8	42,8	44	121	125,8	121	113,5	103,5	118
Qmax, сут	101,2	81	86	85,3	50,5	47	132,1	141	134	124,8	116,3	135
ККВ, %	26,1	19,3	31,3	17,7	8,4	11,3	12,2	15,0	9,3	14,0	15,9	22,0

Самцы и самки мух из линии Мбд, жившие с линией Мн, имели медианную ПЖ 40 и 53 сут, с линией Ма – 88 и 100 сут. Таким образом, медианная ПЖ одной и той же линии (Мбд) различается в 2–2,5 раза в зависимости от того, с какой из линий мух (Мн или Ма) она сожительствовала (табл. 5). Мухи из линии Мбд при совместном проживании с короткоживущими мухами Мн прожили намного меньше, чем в случае совместного проживания с долгоживущими мухами Ма.

Не наблюдается значимой разницы по ПЖ между самками и самцами ни в линии Мн, ни в линии Ма, когда мухи живут с партнерами из своей линии. Также нет значимых различий по ПЖ в боксах ♂Мн♀Мбд и ♂Мбд♀Мн, но мухи из линии Ма живут значимо дольше своих партнеров из линии Мбд в вариантах теста ♂Ма♀Мбд и ♂Мбд♀Ма (табл. 6, сравнения 3–8).

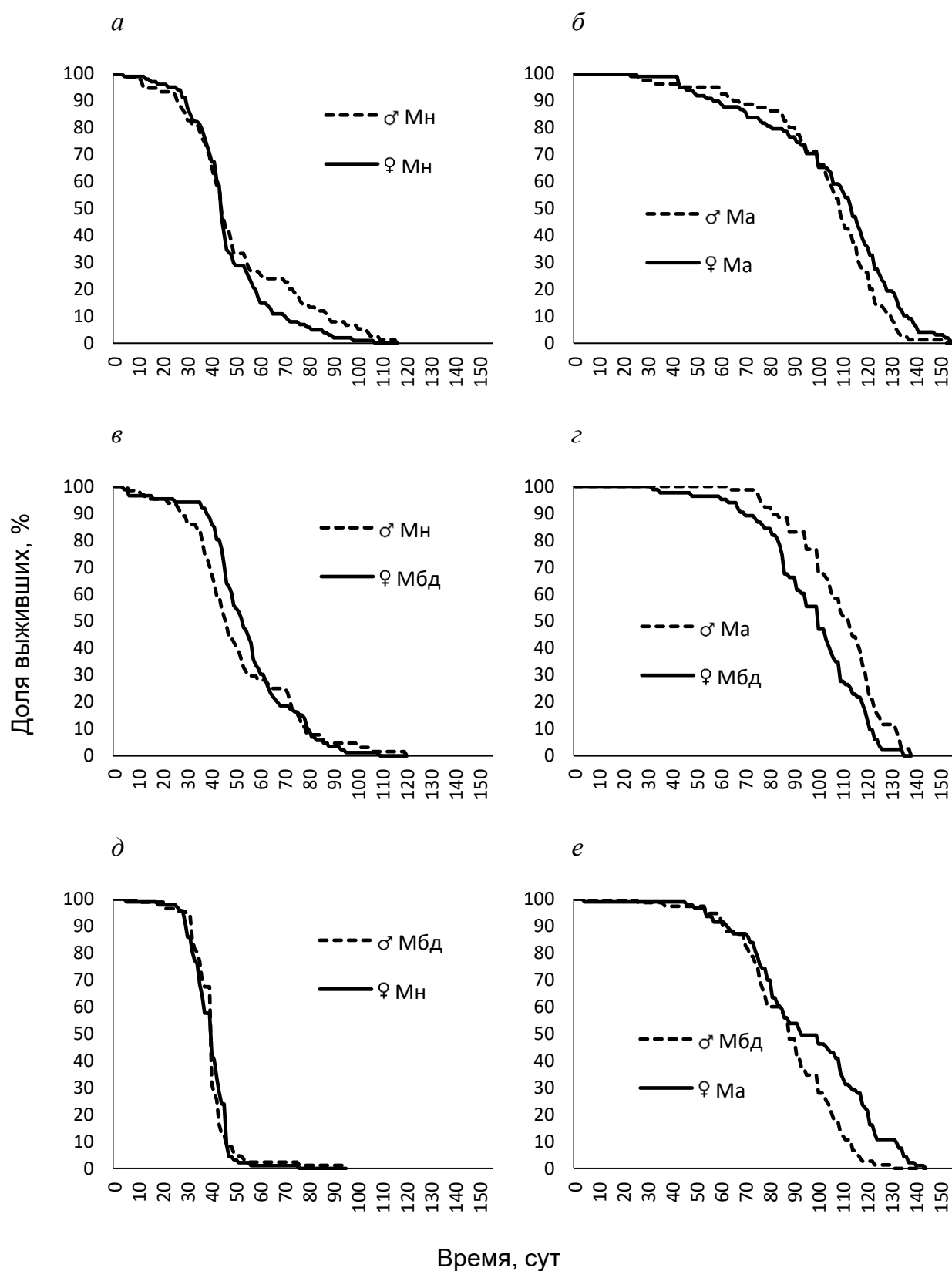


Рисунок 18. Кривые выживания мух в шести вариантах тестирования на совместное проживание (N см. в табл. 5). Обозначения как на рис. 17.

Таблица 6. Тест 13. Проверка значимости различий по ПЖ в когортах мух, тестируемых на совместное проживание.

№ сравнения	Пары для сравнения	Медианная ПЖ, сут	р-значение*	Значимость различий по ПЖ на 5% уровне значимости
Различия по ПЖ мух в линиях Мн и Ма (как в Тесте 12)				
1	♂Мн, жившие с ♀Мн / ♂Ма, жившие с ♀Ма	44 / 109	<< 0,001	Да
2	♀Мн, жившие с ♂Мн / ♀Ма, жившие с ♂Ма	44 / 114	<< 0,001	Да
Сопоставление ПЖ разнополых когорт, тестируемых вместе (исходные данные)				
3	♂Мн♀Мн	44 / 44	0,138	Нет
4	♂Мн♀Мбд	46 / 53	0,450	Нет
5	♂Мбд♀Мн	40 / 40	0,953	Нет
6	♂Ма♀Ма	109 / 114	0,060	Нет
7	♂Ма♀Мбд	113 / 100	0,006	Да
8	♂Мбд♀Ма	88 / 93	<< 0,001	Да
Влияние на ПЖ социальных факторов (совместного проживания с мухами из своей или чужой линии)				
9	♂Мн, жившие с ♀Мн / ♂Мн, жившие с ♀Мбд	44 / 46	1	Нет
10	♀Мн, жившие с ♂Мн / ♀Мн, жившие с ♂Мбд	44 / 40	< 0,001	Да
11	♂Ма, жившие с ♀Ма / ♂Ма, жившие с ♀Мбд	109 / 113	0,450	Нет
12	♀Ма, жившие с ♂Ма / ♀Ма, жившие с ♂Мбд	114 / 93	0,005	Да
Влияние мух-сожителей на ПЖ мух из линии Мбд				
13	♂Мбд, жившие с ♀Мн / ♂Мбд, жившие с ♀Ма	40 / 88	<< 0,001	Да
14	♀Мбд, жившие с ♂Мн / ♀Мбд, жившие с ♂Ма	53 / 100	<< 0,001	Да
Сопоставление ПЖ мух из линий Мн и Ма, живущих с Мбд				
15	♂Мн, жившие с ♀Мбд / ♂Ма, жившие с ♀Мбд	46 / 113	<< 0,001	Да
16	♀Мн, жившие с ♂Мбд / ♀Ма, жившие с ♂Мбд	40 / 93	<< 0,001	Да
Сопоставление ПЖ мух из линий Мбд и Ма				
17	♂Ма, жившие с ♀Мбд / ♂Мбд, жившие с ♀Ма	113 / 88	<< 0,001	Да
18	♀Ма, жившие с ♂Мбд / ♀Мбд, жившие с ♂Ма	93 / 100	0,450	Нет

* р-значение рассчитано с помощью логрангового критерия с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения.

4.3.1 Влияние социальных факторов: зависит ли ПЖ самцов и самок Ма и Мн от совместного проживания с партнерами из своей или чужой линии?

Чтобы понять, как влияют партнеры противоположного пола на ПЖ тестируемых мух, мы провели попарные сравнения ПЖ для самцов и самок из линий Ма и Мн, живущих с партнерами из своей и чужой линии (в роли чужой линии выступала линия Мбд). Из табл. 6 (сравнения 9–12) видно, что ПЖ самцов из обеих линий мало зависит от того, с самками из какой линии они живут. Однако самки из линий Ма и Мн со своими самцами живут значительно дольше, чем с чужими. Медианная ПЖ самок из линии Мн сократилась на 9% в результате жизни с самцами из линии Мбд (с 44 до 40 сут), а медианная ПЖ самок из линии Ма в тех же условиях сократилась на 18% (со 114 до 93 сут). Таким образом, жизнь с чужими самцами сокращает жизнь самок, в то время как сожительство с чужими самками не влияет значимо на ПЖ самцов.

4.3.2 Влияние микробиоты: зависит ли ПЖ мух из линии Мбд от того, с какой из двух других линий (Ма или Мн) они проживают вместе?

Микробиота у дрозофил передается как вертикально (от родителей к потомкам), так и горизонтально. Происходит это через субстрат, на котором питаются мухи и на который они откладывают яйца. Логично предположить, что если мухи из разных линий живут вместе, то их микробиота смешивается. Из табл. 6 (сравнения 13–14) видно, что самцы из бокса ♂Мбд♀Мн живут в 2,2 раза меньше, чем самцы из бокса ♂Мбд♀Ма (40 сут против 88 сут). Как отмечалось выше, *поведение* самок вряд ли сильно влияет на ПЖ самцов (также см. п. 6 из «Обзора литературы»), поэтому наблюдаемый эффект логичнее отнести на счет *микробиоты*. Та же закономерность верна и для самок Мбд: ПЖ самок Мбд, живущих с самцами Мн, почти в 2 раза меньше, чем ПЖ самок Мбд, живущих с самцами Ма (53 против 100 сут). Хотя поведение самцов может влиять на ПЖ самок, в данном случае, вероятнее всего, ведущую роль играет микробиологический фактор.

Эти результаты согласуются с предположением о том, что либо микробиота Мн сокращает ПЖ мух, либо микробиота Ма – продлевает (для выбора одного из этих вариантов нужны дополнительные данные). Получается, что мухи из линии Мбд как бы перенимают ПЖ у мух из линии, с которой живут – ПЖ оказалась «заразным» признаком. Однако микробиота Мбд, скорее всего, не влияет на ПЖ дрозофил, поскольку ПЖ самцов Мн в присутствии своих самок и самок Мбд различается не значимо (сравнение 9); так же и ПЖ самцов Ма в присутствии своих самок и самок Мбд различается не значимо (сравнение 11).

4.3.3 Вклад генетических изменений, обусловленных отбором на долголетие, в продление жизни мух из линии Ма.

Сравнения 1 и 2 в табл. 6 (как и результаты Теста 12, табл. 4) свидетельствуют о наличии значимых различий по ПЖ между самцами линий Ма и Мн и между самками линий Ма и Мн. Чтобы исключить влияние поведения и микробиоты полового партнера на ПЖ мух, сравним ПЖ самцов Мн и Ма, живущих с самками Мбд (исключено возможное влияние самок на ПЖ самцов) и ПЖ самок Мн и Ма, живущих с самцами Мбд (исключено возможное влияние различий микробиоты, полового поведения и состава семенной жидкости самцов на ПЖ самок) (сравнения 15-16 в табл. 6). Различия также остаются значимыми. Безусловно, такие сравнения не позволяют исключить влияние собственной микробиоты на ПЖ изучаемых мух в данной постановке теста, а выше мы показали, что влияние микробиоты в линиях Мн и Ма на ПЖ может быть весьма значительным.

Сопоставим ПЖ самцов Мбд и Ма и самок из тех же линий при проживании с партнерами из другой линии (сравнения 17–18 из табл. 6). Самцы Ма живут значимо дольше самцов Мбд (на 28%). У самок ПЖ отличается не значимо, но в этом случае не исключено влияние самцов на ПЖ самок, так как результаты из табл. 6 позволяют предположить, что жизнь с чужими самцами сокращает жизнь самкам Ма, что мешает оценить вклад генетического фактора в результаты отбора на долголетие.

Таким образом, ответ на поставленный в заголовке данного пункта вопрос – мы не можем сделать однозначный вывод о роли генетического фактора исходя из дизайна тестирования, так как влияние различных факторов переплетено. Однако, можем заключить, что эффект вряд ли является сильным, в противном случае мы бы наблюдали превышение ПЖ мух из линии Ма во всех вариантах тестов, а это не так (сравнение 18 из табл. 6).

Выделить в чистом виде эффект генетического фактора (и показать, что он не может полностью объяснить увеличение ПЖ мух в линии Ма), без влияния социальных и микробиологических факторов, затруднительно, поэтому можно пойти другим путем. Была поставлена задача оценить вклад микробиологического фактора в наблюдаемое увеличение ПЖ мух Ма (по сравнению с предковой линией Мн), произошедшее в результате отбора на долголетие. Для этого были протестированы на ПЖ самки дрозофил с обедненной собственной микробиотой в присутствии микробиоты из разных линий мух.

4.4. Сопоставление продолжительности жизни самок с обедненной собственной микробиотой в присутствии микробиоты дрозофил из разных линий (Тест 14)

Подтверждение значимого вклада микробиоты в изменения ПЖ в эволюционном эксперименте важно для эволюционной биологии, поскольку означало бы, что эволюционные изменения могут происходить не только за счет изменения частот аллелей в генофонде подопытной популяции макроорганизмов, да и рассматривать особь без ее микробиоты в качестве единицы отбора может быть некорректно.

Результаты тестирования на самках, у которых «своя» микробиота была обеднена при выведении, а боксы для тестирования засеивались микробиотой мух-доноров, отражены на рис. 19 и в табл. 7 и 8.

Как и в двух предыдущих тестированиях (Тест 12–13), самки мух из линии Ма прожили значимо дольше самок из линии Мн (табл. 8, сравнение 1). ПЖ самок

Мбд немного (на 5%) ниже ПЖ самок Ма и на 41% выше ПЖ самок Мн, различия в обоих случаях статистически значимы (сравнения 2–3).

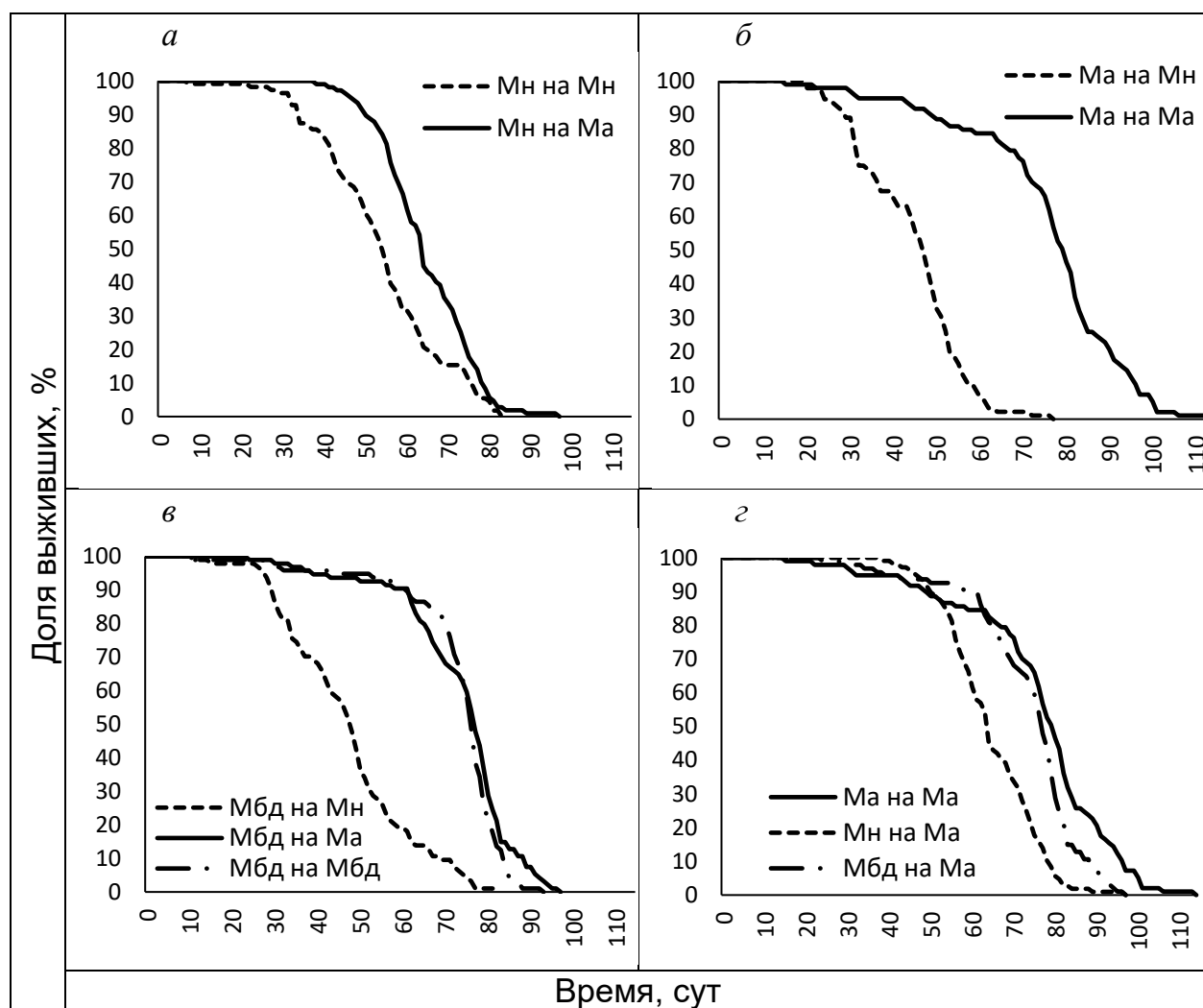


Рисунок 19. Тест 14. Кривые выживания самок из линий Мн (а), Ма (б) и Мбд (в), живущих в присутствии микробиоты Мн, Ма и Мбд (N см в табл. 7); на рис (з) для удобства сгруппированы варианты, тестируемые на микробиоте Ма. В обозначениях на первом месте стоит тестируемая линия, а на втором – линия, на чьей микробиоте мухи тестировались. Обозначения как на рис. 17.

4.4.1 Различия ПЖ самок в присутствии микробиоты из разных линий мух

ПЖ самок Мн на микробиоте Ма почти на 18% выше, чем в присутствии своей микробиоты Мн (64 сут против 54 сут, различия значимы; рис. 19, а). ПЖ самок Ма на своей микробиоте Ма на 70% выше, чем в присутствии микробиоты Мн (80 сут против 47 сут, различия значимы; рис. 19, б).

Таблица 7. Тест 14. Параметры жизненного цикла семи когорт самок, живущих в присутствии различной микробиоты

Показатель, сут	Вариант теста (линия/микробиота)						
	Ма/Ма	Мбд/Ма	Мн/Ма	Ма/Мн	Мбд/Мн	Мн/Мн	Мбд/Мбд
Число особей	97	94	107	92	94	111	96
Средняя ПЖ, сут	76,4	73,8	64,7	44,7	47,4	54,0	73,3
Ст. отклон., сут	18,33	13,81	11,04	11,83	14,71	14,85	12,98
КВ, %	0,24	0,19	0,17	0,26	0,31	0,28	0,18
Q1, сут	71	67,25	57	33,5	35,25	43	72
Медианная ПЖ (Ме), сут	80	77	64	47	48	54	76
Q3, сут	87	81	73,5	53	56	63	79,25
Qmax, сут	100,2	91,35	80,7	61,45	74,35	79	85
ККВ, %	10,0	8,9	12,9	20,7	21,6	18,5	4,8

Таблица 8. Тест 14. Проверка значимости различий по ПЖ в когортах самок, живущих в присутствии различной микробиоты

№ сравнения	Пары для сравнения	Медианная ПЖ, сут	р-значение*	Значимость различий по ПЖ на 5% уровне значимости
	Сопоставление ПЖ самок разных линий, живущих на своей микробиоте (аналогично Тесту 12)			
1	Ма/Ма – Мн/Мн	80 / 54	<< 0,001	Да
2	Ма/Ма – Мбд/Мбд	80 / 76	<< 0,001	Да
3	Мн/Мн – Мбд/Мбд	54 / 76	<< 0,001	Да
	Сопоставление ПЖ самок в присутствии различной микробиоты			
4	Ма/Ма – Ма/Мн	80 / 47	<< 0,001	Да
5	Мн/Ма – Мн/Мн	64 / 54	<< 0,001	Да
6	Мбд/Ма – Мбд/Мн	77 / 48	<< 0,001	Да

7	Мбд/Ма – Мбд/Мбд	77 / 76	0,100	Нет
8	Мбд/Мн – Мбд/Мбд	48 / 76	$\ll 0,001$	Да
Сопоставление ПЖ самок разных линий, живущих в присутствии микробиоты Ма				
9	Ма/Ма – Мн/Ма	80 / 64	$\ll 0,001$	Да
10	Ма/Ма – Мбд/Ма	80 / 77	0,002	Да
11	Мн/Ма – Мбд/Ма	64 / 77	$\ll 0,001$	Да
Сопоставление ПЖ самок разных линий, живущих в присутствии микробиоты Мн				
12	Мн/Мн – Ма/Мн	54 / 47	$\ll 0,001$	Да
13	Мн/Мн – Мбд/Мн	54 / 48	0,002	Да
14	Ма/Мн – Мбд/Мн	47 / 48	0,065	Нет

* р-значение рассчитано с помощью логрангового критерия с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения

Присутствие разной микробиоты значимо влияет также и на ПЖ мух Мбд ($p \ll 0,001$). Самки Мбд на микробиоте Ма и Мбд живут значимо дольше, чем в присутствии микробиоты Мн (76 и 77 сут против 48 сут соответственно). Различия по ПЖ самок Мбд на микробиоте Ма и Мбд незначимы (сравнения 4–8 в табл. 8, рис. 19, в).

Таким образом, микробиота Мн сокращает ПЖ мух из всех трех линий, в том числе и мух из «своей» линии Мн. При переходе со своей микробиоты на микробиоту Ма мухи Мн живут значимо дольше, а ПЖ самок Мбд не отличается на своей микробиоте (Мбд) и микробиоте Ма, из чего можно заключить, что микробиота Ма сама по себе не продлевает жизнь, а рост ПЖ самок Мн при их переходе с микробиоты Мн на микробиоту Ма объясняется частичным снятием негативного влияния микробиоты Мн на их ПЖ.

4.4.2 Сравнение ПЖ самок из разных линий в присутствии той же микробиоты

Согласно логранговому критерию ПЖ самок из разных линий значимо отличается в присутствии той же микробиоты ($p \ll 0,001$ как для микробиоты Ма,

так и для микробиоты Мн). Иными словами, различия по ПЖ объясняются не только привнесенной микробиотой, но и особенностями мух каждой линии, включая в том числе и остаточную собственную микробиоту (напомним, что у мух из тестируемых когорт «своя» микробиота была обеднена при выведении, но исключать передачи через куколку следовых количеств «своей» микробиоты также нельзя).

В присутствии микробиоты Ма ПЖ самок всех трех линий значительно различается (сравнения 9–11 в табл. 8, рис. 19, *г*). Поскольку тестировались только самки, было исключено влияние самцов на ПЖ самок; мухи для тестирования выводились при сопоставимой плотности личинок (минимизация влияния социальных факторов). Мы рассматриваем ПЖ мух на одинаковой микробиоте, а влияние микробиоты Ма на ПЖ мух не подтвердилось (см. п. 4.3.2 и 4.4.1). Из этого следует, что различия по ПЖ самок, тестируемых в присутствии микробиоты Ма, по-видимому, обусловлены в основном генетическим фактором (а также, возможно, остаточной собственной микробиотой самок). Дольше всех, 80 сут, живут самки из линии Ма, подвергшейся отбору на позднее размножение. Самки Мбд живут 77 сут, что значительно меньше, чем ПЖ самок Ма, однако по абсолютному значению различия невелики (4%). Линия Мбд не отбиралась на позднее размножение, но содержалась на корме с фунгистатическим препаратом, что повлияло на состав микробиоты (см. Тесты 8 и 11, пункты 3.1 и 3.4 настоящего раздела). Самки Мн живут 64 сут, что на 20% меньше, чем ПЖ самок в линии Ма. Негативное влияние микробиоты Мн статистически обосновано в п. 4.3.2. Обобщая описанные факты, значимые различия по ПЖ между самками линий Ма и Мбд при выращивании в присутствии привнесенной микробиоты Ма можно интерпретировать как слабый, но все-таки значимый вклад генов в результаты отбора на позднее размножение, а значимые различия по ПЖ между самками Мбд и Мн означают значительный вклад микробиологического фактора в эволюцию ПЖ мух.

В присутствии микробиоты Мн ПЖ самок Мн значительно дольше, чем самок Ма и Мбд, 54 сут против 47 и 48 соответственно (или на 13 и 15% соответственно). ПЖ самок Ма и Мбд в присутствии микробиоты Мн различается незначимо (сравнения 12–14 в табл. 8). Можно предположить, что мухи Мн, хоть и обладают относительно низкой ПЖ, но негативный эффект их микробиоты на ПЖ частично скомпенсирован приспособленностью мух к ней. Тогда как негативный эффект микробиоты Мн на ПЖ мух, к этой микробиоте неприспособленных, настолько ощутим, что небольшие различия по ПЖ между самками Ма и Мбд, обусловленные генетически, полностью нивелируются в присутствии этой микробиоты.

ОБСУЖДЕНИЕ⁷

1. Эволюция продолжительности жизни и возрастной динамики плодовитости дрозофил, адаптированных к неблагоприятным кормам (гомогенные условия)

1.1. Адаптация дрозофил к обедненному крахмальному корму (гомогенные условия)

1.1.1 Изменение ПЖ и динамики плодовитости

В ходе эволюционного эксперимента линия Мк находится в условиях резко повышенной экзогенной смертности имаго. Это видно и по результатам Теста 1, где свежий корм подавался раз в три дня, и в еще большей степени – по результатам Теста 3, где корм подавался раз в неделю, как в эволюционном эксперименте. ПЖ в линии Мн в условиях Теста 1 была понижена на корме К по сравнению с Н на 20 сут (23%), а в условиях Теста 3 – на 52 сут (87%). Таким образом, переход с Н на К вызывает резкий рост смертности у мух дикого типа. Неадаптированные самцы при переходе на К оказались менее выносливыми, чем самки (у самцов Мн сокращение ПЖ на корме К по сравнению с Н значимо больше, чем у самок).

Согласно гипотезе Уильямса, высокая экзогенная смертность должна приводить к наследуемому сокращению ПЖ и сдвигу размножения на ранние сроки (Williams, 1957; Stearns et al., 2000). Согласно предположению о повышении

⁷ Результаты, изложенные в настоящем разделе, опубликованы в следующих научных статьях автора:

Yakovleva E., Danilova I., Maximova I., Shabaev A., Dmitrieva A., Belov A., Klyukina A., Perfilieva K., Bonch-Osmolovskaya E., Markov A. Salt concentration in substrate modulates the composition of bacterial and yeast microbiomes of *Drosophila melanogaster* // Microbiome Research Reports. — 2024. — № 3:19. DOI: 10.20517/mrr.2023.56

Яковлева Е.Ю., Максимова И.А., Мерзликин Д.С., Качалкин А.В., Марков А.В. Влияние разных видов дрожжей на продолжительность жизни и плодовитость *Drosophila melanogaster* // Журнал общей биологии. — 2024. — Т. 85, № 3. — С. 165–186. DOI: 10.31857/S0044459624030013, EDN: VDKRHE

Яковлева Е.Ю., Мерзликин Д.С., Завьялов А.Е., Маслов А.А., Миронова Е.А., Марков А.В. Вклад генов и симбиотической микробиоты в увеличение продолжительности жизни мух *Drosophila melanogaster*, отбираемых на позднее размножение // Журнал общей биологии. — 2022. — Т. 83, № 4. — С. 268–287. DOI: 10.31857/S004445962204008X

Горшкова А.А., Фетисова Е.С., Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние пространственной гетерогенности среды на адаптацию *Drosophila melanogaster* к неблагоприятным кормовым субстратам: результаты эволюционного эксперимента // Журнал общей биологии. — 2018. — Т. 79, № 1. — С. 3–17. EDN: YKWEUY

Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние адаптации *Drosophila melanogaster* к неблагоприятному кормовому субстрату на продолжительность жизни и возрастную динамику плодовитости // Биохимия. — 2016. — Т. 81, № 12. — С. 1721–1739. EDN: XGYNVR

устойчивости организмов под действием избирательной внешней смертности (Williams, Day, 2003; Chen, Maklakov, 2012), адаптация к неблагоприятным условиям может вести, напротив, к увеличению ПЖ. Это может произойти, если высокая смертность имаго на корме К в условиях эксперимента имеет отчасти избирательный характер (зависит от состояния организма) и порождает направленный отбор. Однако, учитывая, что все имаго в популяции Мк гибнут на 5–7 день от смены корма (тогда как личинки и куколки выживают), об избирательности гибели имаго можно говорить только в рамках этого небольшого периода (что, однако, может повлиять на репродуктивный успех тех особей, которые живут на неблагоприятном корме на несколько дней дольше).

В ходе эволюционного эксперимента мухи Мк, по-видимому, относительно успешно адаптировались к обедненной кормовой среде К. Данные показывают, что плодовитость молодых мух Мк повышена по сравнению с мухами Мн того же возраста на обоих кормах (Яковлева и др., 2016). Сдвиг репродуктивного усилия на ранние стадии жизненного цикла может выступать в роли «адаптации широкого профиля», повышая репродуктивный успех особей на разных кормах. В природе важным условием эффективности такой «универсальной адаптации» является высокая экзогенная смертность, которая, как показано в экспериментах Стернса (Stearns) и коллег, снижает шансы мух на долгую жизнь и, следовательно, на размножение в позднем возрасте (Stearns, 2000; Stearns et al., 2000). То же, по-видимому, мы наблюдаем и в условиях эволюционного эксперимента.

Полученные результаты выявляют еще один аспект адаптации мух к обедненной кормовой среде – изменение ПЖ. В линии Мк ПЖ на корме К по сравнению с кормом Н снижается умеренно: на 10,9 сут (15,8%). У мух Мн негативная реакция на корм К выражена сильнее (20,1 сут, 22,8%). Следовательно, у мух Мк повышена не только эффективность размножения в молодости, но и сопротивляемость неблагоприятному действию корма К, который в целом стал для мух Мк менее неблагоприятным, чем для мух Мн. Вероятно, о том же свидетельствует и снижение фенотипической пластичности скорости

репродуктивного старения у мух Мк. В этой линии, в отличие от Мн, корм К не ускоряет репродуктивное старение по сравнению с кормом Н (рис. 4, в, г). Это можно рассматривать как свидетельство успешной адаптации мух Мк к неблагоприятному корму.

Таким образом, полученные результаты во многом согласуются с гипотезой Уильямса. Действительно, у мух Мк по сравнению с контрольными мухами Мн в благоприятных условиях на корме Н наблюдается сокращение ПЖ, рост относительной плодовитости в молодости и ускоренное репродуктивное старение (рис. 3, 4). Наши результаты показывают, что наследуемые изменения жизненного цикла, предсказываемые гипотезой Уильямса, могут происходить не только в ответ на искусственно вызываемую смертность или искусственный отбор на раннее (или позднее) размножение, как это было показано в ряде работ (Rose, Charlesworth, 1981; Rose, 1984a; Luckinbill et al., 1984; Mueller, 1987; Partridge, Fowler, 1992; Partridge et al., 1999; Stearns et al., 2000; Travers et al., 2015), но и в ходе адаптации популяций к неблагоприятной среде обитания.

Причины сокращения ПЖ в линии Мк могут быть различными. С одной стороны, как говорилось выше, этот результат согласуется с гипотезой Уильямса и может быть следствием ослабления отбора на поздних стадиях жизненного цикла из-за высокой внешней смертности, что способствует накоплению вредных мутаций с поздним эффектом и плеiotропных аллелей, повышающих раннюю плодовитость ценой снижения жизнеспособности в старшем возрасте.

Другое возможное объяснение – накопление вредных мутаций из-за дрейфа в маленькой популяции и инбредная депрессия, в основе которой лежит переход рецессивных вредных аллелей в гомозиготное состояние. Действительно, эффективная численность популяции Мк в ходе эволюционного эксперимента была ниже, чем популяции Мн (еженедельный выплод имаго в Мк в 2–4 раза ниже, чем в Мн, а численность живых имаго из-за высокой смертности – на 1–2 порядка ниже). В середине прошлого века было показано, что в высокоинбредных линиях дрозофил ПЖ снижается (Clarke, Smith, 1955). Однако идея о зависимости ПЖ

лабораторных дрозофил от степени инбридинга не нашла дальнейших подтверждений. Так, в исследовании Линнена с коллегами (Linnen et al., 2001) была оценена ПЖ в нескольких старых лабораторных линиях, в том числе подвергавшихся отбору на раннее или позднее размножение, и был сделан вывод о незначительном влиянии инбридинга на сокращение ПЖ по сравнению с эффектом отбора на раннее размножение. Если сокращение ПЖ обусловлено инбредной депрессией или накоплением рецессивных аллелей с поздним негативным эффектом, то следует ожидать, что гибриды, полученные от скрещивания разных линий, будут демонстрировать увеличенную ПЖ благодаря росту гетерозиготности (эффект «гибридной силы»). Однако было показано, что этот эффект не замедляет старение и не продляет жизнь мух, выработавших укороченный жизненный цикл в результате отбора на раннее размножение. Это было интерпретировано как результат, не подтверждающий роль пассивного накопления вредных мутаций с поздним эффектом в эволюции старения, но согласующийся с идеей об антагонистической плейотропии (Rose et al., 2002).

1.1.2 Возможные причины наблюдаемого полового диморфизма

Несмотря на то, что сокращение ПЖ мух Мк в ходе адаптации к неблагоприятному крахмальному корму в целом согласуется с гипотезой Уильямса, есть один нюанс. Уильямс утверждал, что если его теория верна, то быстрее стареть и иметь меньшую ПЖ в благоприятных условиях должен тот пол, для которого характерна более высокая внешняя смертность (Williams, 1957). Наши данные показывают, что корм К увеличивает смертность самцов в большей степени, чем самок (рис. 3, табл. 1): у самцов Мн средняя ПЖ на корме К на 31,2 сут меньше, чем на корме Н, а у самок – только на 10,1 сут. Следовательно, согласно гипотезе Уильямса, самцы Мк на корме Н (то есть в благоприятных условиях) должны иметь меньшую ПЖ, чем самки. В действительности средняя ПЖ самцов Мк на корме Н составила 71,5 сут, самок – 67,1 сут, это различие статистически незначимо (табл. 1). Таким образом, адаптированные к корму К

самцы не уступают по ПЖ самкам.

Возможно, это несоответствие объясняется тем, что высокая экзогенная смертность мух Мк в ходе эволюционного эксперимента, во-первых, хотя бы в некоторой степени избирательна (зависит от состояния организма), во-вторых, по-разному действует на самцов и самок. В литературе подобное явление описано: половой диморфизм по ПЖ возникал под влиянием высокой смертности самцов *C. remanei* (Chen, Maklakov, 2014). В этом эксперименте моделировали высокую смертность самцов как случайную, так и избирательную (оставляли только самцов с высокой репродуктивной активностью). При избирательной элиминации самцов их ПЖ быстро увеличивалась, оказавшись к концу эксперимента резко отличной от ПЖ самок, у которых ПЖ не изменилась. При неизбирательной элиминации полового диморфизма по ПЖ не появилось.

Появление полового диморфизма можно интерпретировать как пример рассогласования генетических регуляций ПЖ у самцов и самок (Nuzhdin et al., 1997; Lehtovaara et al., 2013). Считается, что в ходе адаптации к неблагоприятным условиям отбор нередко бывает направлен в первую очередь на самок. Так будет, если репродуктивный успех самок в критической обстановке сильнее зависит от наследственных особенностей их физиологии, поведения и параметров жизненного цикла, чем репродуктивный успех самцов от аналогичных мужских признаков. Самцы при этом оказываются «второстепенным материалом» и вынуждены довольствоваться неоптимальными для своих репродуктивных и жизненных задач аллелями, если эти аллели существенно повышают репродуктивную эффективность самок (конфликт генетических регуляций) (Waddington, 1953).

В нашем случае, несмотря на более высокую смертность самцов, ПЖ самок Мк сократилась сильнее (по сравнению с самками Мн), чем ПЖ самцов.

Таким образом, высокая и, возможно, отчасти избирательная внешняя смертность привела к формированию полового диморфизма в ходе адаптации к неблагоприятным условиям, расширяя круг животных, демонстрирующих это явление. Зная, что различия по ПЖ у самцов и самок *Drosophila* имеют

внушительную генетическую базу (Nuzhdin et al., 1997; Lehtovaara et al., 2013), можно предположить, что в ходе адаптации к обедненной кормовой среде у мух Мк закрепились генетические изменения, по-разному влияющие на ПЖ самцов и самок, в результате чего половой диморфизм стал наследственным. Последнее предположительно объясняется повышенной «эволюционной сопротивляемостью» самцов по сравнению с самками, вероятно, в связи с более эффективным отбором, действовавшим на самцов, или же с тем, что самцам приходится платить меньшую физиологическую «цену» за рост репродуктивного усилия в молодости (Sgrò, Partridge, 1999).

Однако данные рассуждения лежат в стороне от основного направления рассуждений по проблемам эволюции параметров жизненного цикла и потому нуждается в более широком эмпирическом подтверждении (Яковлева и др., 2016).

1.1.3 Соотношение фенотипической пластичности и направленности адаптивных изменений

Все показатели, которые свидетельствуют об адаптации мух Мк к корму К (увеличение эффективности размножения в молодом возрасте, повышение устойчивости параметров жизненного цикла при смене корма), а также сокращение ПЖ и половой диморфизм кривых выживания, скорее всего, взаимосвязаны и отражают комплексные изменения жизненного цикла при переходе на неблагоприятный корм. Эти изменения могут быть как наследственными, так и ненаследственными (модификационными). Чтобы разделить одно от другого и получить возможность сравнивать модификационные изменения с адаптивными, в ходе основного теста мухи обеих линий тестировались как на благоприятном корме Н, так и на стрессовом корме К.

Наши результаты, как и результаты других экспериментов, согласующиеся с гипотезой Уильямса (Rose, Charlesworth, 1981; Rose, 1984a; Luckinbill et al., 1984; Mueller, 1987; Partridge, Fowler, 1992; Stearns et al., 2000; Travers et al., 2015), подтверждают, что сокращение ПЖ, вызываемое неблагоприятными условиями

среды, со временем может стать наследственным (Waddington, 1953; Crispo, 2007).

Эволюционная роль фенотипической пластичности, как адаптивной (полезной), так и неадаптивной, дискутируется в литературе (Иорданский, 2009; Fitzpatrick, 2012). Показано, что неадаптивная фенотипическая пластичность может способствовать эволюционным изменениям, направленным в сторону, противоположную пластическим изменениям (Ghalambor et al., 2015). Например, для многих пойкилотермных животных характерно замедление развития при понижении температуры, что отнюдь не способствует успешной адаптации к высоким широтам, где из-за короткого лета выгодно, наоборот, развиваться быстрее. В такой ситуации неадаптивная фенотипическая пластичность будет способствовать усилению отбора на ускоренное развитие. Это приводит к так называемой «генетической компенсации», когда неадаптивные пластические (ненаследственные) изменения компенсируются адаптивными наследственными (Grether, 2005). Также предполагается, что неадаптивная фенотипическая пластичность и материнские эффекты могут тормозить дивергенцию, способствуя вытеснению локально адаптированных особей мигрантами из благоприятных местообитаний (Fitzpatrick, 2012); эмпирическое подтверждение этой идеи было получено в рамках эволюционного эксперимента на *D. melanogaster* на кафедре биологической эволюции МГУ (Марков и др., 2015).

Жизнь на корме К стимулирует мух к более интенсивной откладке яиц. Можно предположить, что диета с высоким содержанием крахмала влияет на плодовитость через повышение активности сигнального каскада с участием инсулиноподобных пептидов (ILP), о котором известно, что он влияет также и на ПЖ (Partridge et al., 2011; Pasco, Léopold, 2012). Этот эффект особенно силен у молодых мух Мн, не адаптированных к корму К (рис. 4, в). Иными словами, крахмальный корм сам по себе повышает раннюю плодовитость, что явно является адаптивным свойством, повышающим репродуктивный успех на неблагоприятном корме К. У мух Мк в ходе адаптации к корму К данное изменение стало наследственным (рис. 4, а).

Сокращение ПЖ, непосредственно вызываемое жизнью на неблагоприятном корме, можно интерпретировать как неадаптивную фенотипическую пластичность. Впрочем, утверждение о неадаптивности сокращения ПЖ на обедненном корме нуждается в обосновании. С одной стороны, известно, что мухи *D. melanogaster* размножаются до самой смерти, производя жизнеспособное потомство даже в терминальном возрасте (Rauser et al., 2006). Поэтому ранняя смерть, при прочих равных, снижает репродуктивный успех особи. С другой стороны, мы не можем исключить, что ранняя смерть имаго на обедненном корме выгодна для популяции в целом, например, если дефицитные пищевые ресурсы, не использованные погибшими имаго, эффективнее утилизируются личинками. Однако ранняя смерть как «адаптация на благо группы» не может быть поддержана обычным отбором на индивидуальном уровне. Теоретически, ее мог бы поддержать групповой отбор (но он не действует в пределах единственной подопытной линии), родственный отбор (Марков, 2012) или «отбор второго порядка на эволюционную перспективность» (Woods et al., 2011), но эти формы отбора тоже едва ли могут действовать в условиях эксперимента, поскольку ресурсы, высвобождаемые погибшей взрослой особью, не оказываются в эксклюзивном распоряжении ее потомства, а становятся доступны в равной мере потомству всех особей в популяции. В условиях эксперимента, по-видимому, эффективен только обычный индивидуальный отбор на уровне особей, то есть актуальна только адаптивная выгода особи, и с этой точки зрения сокращение ПЖ является неадаптивным пластическим изменением фенотипа. Тем не менее в ряду поколений признак сначала вызывается непосредственным воздействием среды, но затем становится наследственным. Ситуацию легче всего объяснить с позиций гипотезы Уильямса, поскольку данное неадаптивное пластическое изменение (сокращение ПЖ из-за ухудшения условий существования) выводит из-под действия отбора поздние стадии жизненного цикла, выпадение которых и составляет суть пластического изменения, которое затем становится наследственным. Поздние стадии атрофируются под грузом мутаций, подобно неиспользуемому органу.

Таким образом, согласующиеся с гипотезой Уильямса случаи адаптивного сокращения ПЖ в результате роста экзогенной смертности расширяют представления об эволюционной роли фенотипической пластичности и о возможных соотношениях между направленностью пластических и эволюционных изменений (Яковлева и др., 2016).

1.2. Адаптация дрозофил к корму с высоким содержанием соли (гомогенные условия)

Выше показано, что у мух Мк в ходе адаптации к неблагоприятному, крахмальному корму сильно сократилась продолжительность жизни имаго (в том числе и при тестировании на благоприятном корме Н), репродукция сдвинулась на более молодой возраст, а репродуктивное старение ускорилось по сравнению с контрольными мухами Мн (Марков и др., 2016; Яковлева и др., 2016). Это можно интерпретировать как ожидаемый адаптивный ответ на высокий уровень неизбежной смертности имаго, обусловленный жизнью на крахмальном корме. Такой ответ полностью согласуется с классической «эволюционной теорией старения», согласно которой одной из главных причин универсальности феномена старения является ослабленное действие очищающего отбора на мутации, вредные эффекты которых проявляются в позднем возрасте, вероятность дожития до которого была бы мала даже при отсутствии старения (Medawar, 1952; Hamilton, 1966; Rose, 1991). Из этой теории следует, что рост безвыборочной смертности половозрелых особей должен способствовать эволюции ускоренного старения, сокращению ПЖ и сдвигу репродукции на ранний возраст (стратегия «живи быстро, умри молодым») (Williams, 1957; Kirkwood, 1977; Kirkwood, Rose, 1991; Stearns et al., 2000).

Корм с высоким содержанием соли, как и крахмальный, также является стрессовой средой. Несмотря на то, что соленый корм после экспериментов Уоддингтона стал излюбленной средой для проведения эволюционных экспериментов на дрозофилах (Waddington, 1959; Te Velde et al., 1988; Stergiopoulos

et al., 2009; Long et al., 2013; Arbuthnott, Rundle, 2014; Дмитриева и др., 2016; Yakovleva et al., 2024), ранее не изучалось то, как адаптация к нему отражается на ПЖ и плодовитости мух.

Наш результат показывает, что в отличие от мух Мк, у мух Мс в ходе адаптации к стрессовому корму не было выявлено ни сокращения ПЖ, ни сдвига репродукции на более ранний возраст, ни ускорения репродуктивного старения по сравнению с Мн (рис. 5–7; Тест 6, гомогенные условия). Это может объясняться, во-первых, меньшим уровнем смертности имаго на корме С по сравнению с кормом К, а, во-вторых, более избирательным характером этой смертности. В пользу справедливости этих объяснений говорит тот факт, что дрозофилы, которые в природе никогда не встречаются на соленых субстратах, адаптируются к соленому корму за несколько десятков поколений (крайне быстро по эволюционным меркам) (Waddington, 1959; Te Velde et al., 1988; Zhang et al., 2011; Long et al., 2013; Arbuthnott, Rundle, 2014; Дмитриева и др., 2016).

В эволюционном эксперименте в боксах с кормом К к концу недельного цикла (когда самому «свежему» крахмальному корму в боксе около 5–7 дней) наблюдалась практически тотальная смертность имаго (хотя личинки и куколки выживают). Поголовная гибель всех имаго – это неизбирательная смертность, тогда как в боксах с кормом С никогда не наблюдалась аналогичной тотальной гибели имаго. Несмотря на довольно высокую смертность, значительное число живых имаго всегда присутствовало в боксе С, поэтому такую смертность можно считать избирательной.

Кроме того, наблюдения за подопытными линиями показывают, что по прошествии нескольких суток соленый корм становится привлекательным для дрозофил. Скорее всего, это обусловлено развитием на его поверхности богатой дрожжевой микробиоты. Симбиотическая микробиота может сильно влиять на приспособленность макроскопических организмов, в том числе дрозофил, к различным условиям среды (Margulis, Fester, 1991; Zilber-Rosenberg, Rosenberg, 2008; Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011; Blum et al., 2013; Erkosar et al., 2013). Ранее

коллегами с кафедры биологической эволюции было показано, что адаптация мух к соленому корму в ходе эволюционного эксперимента во многом объясняется именно изменениями симбиотической микробиоты (Ивницкий и др., 2018). Это подтверждается тем, что мухи эффективнее размножаются на соленом корме, на который был предварительно нанесен гомогенат мух из адаптированных к соли линий, чем на таком же корме, на который был нанесен гомогенат мух, не адаптированных к соли (Панченко и др., 2017). Микробиота может относительно устойчиво передаваться от родителей к потомкам благодаря тому, что потомки питаются кормом, на котором до этого жили родители (Blum et al., 2013).

Таким образом, в ходе адаптации к корму с повышенным содержанием соли не произошло сокращения ПЖ в подопытной популяции. Это может быть связано с иным характером экзогенной смертности, чем при адаптации к крахмальному корму. В данном случае смертность более избирательна, то есть зависит от состояния организма. В ходе адаптации к соленому корму преимущество при отборе, по-видимому, имели мухи, наиболее устойчивые к неблагоприятным условиям.

Ряд экспериментов на дрозофилах показал, что избирательная (зависящая от состояния организма) смертность может вести не к сокращению, а, наоборот, к росту ПЖ в череде поколений (Williams, Day, 2003; Chen, Maklakov, 2012). Роста ПЖ в нашем исследовании выявить не удалось. Возможно, для достижения такого результата необходимо больше времени. На момент постановки Теста 6 линии находились в условиях эксперимента только 21 месяц, что примерно соответствует 15–40 поколениям (Горшкова и др., 2018).

Отмеченное снижение плодовитости мух Мс (Тест 7, гомогенные условия), обусловленное пониженной плодовитостью в раннем возрасте как на корме Н, так и на корме С по сравнению с контрольной линией (Мн) требует дополнительного исследования. Можно предположить, что адаптация к неблагоприятному соленому корму привела к сдвигу в сторону репродуктивной К-стратегии. Это могло произойти в том случае, если на соленом корме выживают только самые сильные

личинки, вышедшие из яиц с большим количеством желтка. В такой ситуации селективное преимущество получают мухи, откладывающие меньше яиц, но более богатых желтком. Реализация такого компромисса между количеством и качеством потомков вполне возможна в неблагоприятных условиях (Ebert, 1993; Charnov, Ernest, 2006; Walker et al., 2008; Galor, Klemp, 2019), однако для проверки этой гипотезы необходимо оценить качество яиц, откладываемых мухами из линии Mc.

Другой гипотезой, объясняющей пониженную плодовитость мух Mc, может быть идея о том, что личинки, вышедшие из яиц, отложенных на свежий корм, не заселенный дрожжами, погибают. Ведь дрожжи являются одним из основных источников пищи для личинок дрозофил (Cooper, 1960; Begon, 1982; Anagnostou et al., 2010). Тогда как личинки, вышедшие из яиц, отложенных на более старый корм, заселенный дрожжами, получают селективное преимущество. Если среди имаго существует изменчивость по предпочтениям к запаху корма, то в этом случае откладка яиц в ответ на запах дрожжей дает данным особям селективное преимущество. Это означает, что мухи, адаптированные к соленому корму, не торопятся откладывать яйца на свежий корм (особенно в первый час после его постановки в бокс), а начинают это делать только при появлении запаха дрожжей (свидетельствующего, что на корме уже размножились дрожжи, необходимые для развития личинок). Данная гипотеза имеет право на существование, так как во множестве работ (в том числе экспериментальных) показано, что *D. melanogaster* способна различать сотни запахов, а ее запаховые и вкусовые предпочтения в значительной степени влияют на выбор субстратов для откладки яиц; показано даже, что муха чаще предпочитает тот корм, с которым уже имела дело ранее (Dweck et al., 2013; Depetris-Chauvin et al., 2015; Billeter, Wolfner, 2018; Otárola-Jiménez et al., 2024). Кроме того, ранее было показано, что в других линиях, культивируемых на кормах Н и С, адаптация к высокой концентрации соли может приводить к росту эффективности размножения не только на корме С, но и на корме Н, то есть к генерализации и расширению трофической ниши (Дмитриева и др., 2016). Таким образом, в случае справедливости «запаховой» гипотезы

плодовитость мух Мс в ходе адаптации к соленому корму не сократилась, просто выбранный нами тест для оценки плодовитости не релевантен, он не позволяет оценить истинную плодовитость самок из линии Мс, так как откладка основной массы яиц происходит не на свежий корм, а только после развития дрожжевой микробиоты на нем.

2. Эволюция параметров жизненного цикла дрозофил, адаптированных к различным кормам в условиях пространственной гетерогенности среды

2.1. Показатели приспособленности, возможные причины успешной адаптации, направление отбора

Основной задачей Тестов 4–7 была оценка влияния пространственной гетерогенности среды на ход адаптации *D. melanogaster* к различным кормам и на изменение параметров жизненного цикла в процессе такой адаптации. Для этого сравнивались показатели приспособленности линий, культивируемых в течение 21 месяца либо в пространственно гетерогенных условиях (линии Мсс и Мкс, представляющие собой единую частично подразделенную популяцию, содержащуюся в двойном боксе с возможностью выбора крахмального или соленого корма), либо в условиях гомогенной благоприятной (Мн) или неблагоприятной (Мс, Мк) среды.

В общей сложности было проведено 10 сравнений, позволивших оценить следующие аспекты приспособленности мух к кормам:

Тест 4:

- 1) эффективность размножения на корме Н (рис. 8, а);
- 2) эффективность размножения на корме С с 4% соли (рис. 8, б);

Тест 5:

- 3) эффективность размножения на корме С с 5,5% соли (рис. 8, в);
- 4) эффективность размножения на корме К (рис. 8, г);

Тест 6:

- 5) ПЖ на корме Н (рис. 9, а, б);

6) ПЖ на корме С с 4% соли (рис. 9, б, в);

Тест 7:

7) темп репродуктивного старения (СВС) на корме Н (рис. 10, а);

8) СВС на корме С с 4% соли (рис. 10, б);

9) суммарный коэффициент плодовитости (СКП) на корме Н;

10) СКП на корме С с 4% соли.

В большинстве случаев (а именно в восьми сравнениях из десяти) мухи, культивируемые в пространственно гетерогенной среде (Мсс, Мкс), продемонстрировали более высокие показатели приспособленности, чем мухи, культивируемые в гомогенной среде (Мн, Мс, Мк).

Так, по числу половозрелых потомков, произведенных за фиксированное время, мухи из линий Мсс и Мкс опередили мух из линий Мс и Мн на кормах К, С с 4% соли и С с 5,5% соли; на последнем типе корма они опередили также линию Мк, которую удалось протестировать только в этом единственном опыте (сравнения 2, 3, 4). Самки Мсс также продемонстрировали более высокую ПЖ на кормах Н и С с 4% соли по сравнению с самками Мс и Мн; у самцов различия направлены в ту же сторону, хотя и не достигают уровня статистической значимости (сравнения 5, 6). Темп репродуктивного старения у самок Мсс оказался ниже, чем у самок Мс и Мн, при тестировании на кормах Н и С с 4% соли (сравнения 7, 8). Наконец, общая плодовитость (СКП) у самок Мсс оказалась выше, чем у самок Мс и Мн, при тестировании на корме Н (сравнение 9).

Если сгруппировать результаты по типу корма, на котором проводилось тестирование, то можно увидеть, что мухи, культивируемые в гетерогенных условиях, опередили другие линии на корме Н в трех случаях из четырех (сравнения 5, 7, 9), на корме С – в четырех случаях из пяти (сравнения 2, 3, 6, 8), на корме К – в одном случае из одного (сравнение 4).

Лишь в двух случаях из десяти (сравнения 1 и 10) мухи, культивируемые в гетерогенных условиях, уступили мухам, культивируемым в гомогенных условиях. Рассмотрим эти выбивающиеся из общей тенденции случаи более подробно. В

первом случае мухи Мн продемонстрировали более высокую эффективность размножения на корме Н, чем мухи Мсс, Мкс и Мс (рис. 8, а). Это можно интерпретировать как аргумент в пользу того, что линиям Мсс и Мкс, а также Мс, пришлось заплатить некоторую «цену» за адаптацию к неблагоприятным кормам, что проявилось в снижении их приспособленности к благоприятному корму Н по сравнению с контрольной линией Мн. Однако такому выводу противоречат результаты сравнений 5, 7 и 9, показывающие, что мухи, культивируемые в гетерогенной среде, при тестировании на корме Н характеризуются более высокими показателями продолжительности жизни и плодовитости, а также замедленным репродуктивным старением по сравнению с мухами Мн. Также, возможно, результаты сравнения 1 не вполне информативны и их не стоит принимать в внимание, так как вылет потомков на корме Н отслеживался только в первые 7 дней, а не до момента вылета последней мухи. Иными словами, соотношение суммарного выплода потомков за весь период вылета могло оказаться иным, чем за первые 7 дней, на что, например, намекает пересечение кривых кумулятивного выплода на других кормах как раз около 17 дня с момента посадки родителей.

Кроме того, ранее было показано, что в других линиях, культивируемых в гомогенных условиях на кормах Н и С, адаптация к высокой концентрации соли может приводить к росту эффективности размножения не только на корме С, но и на корме Н, то есть к генерализации и расширению трофической ниши (Дмитриева и др., 2016). Таким образом, результаты сравнения 1, показавшие пониженную эффективность размножения мух Мс (а также Мсс и Мкс) на корме Н по сравнению с мухами Мн, едва ли отражают общее правило.

В еще большей степени это относится к результатам сравнения 10, которое показало пониженное число яиц, откладываемых самками Мсс на корме С по сравнению с самками Мс и Мн. Как отмечалось в пункте 1.2 настоящего раздела, учет яиц на корме С затруднен, поскольку мухи крайне неохотно откладывают яйца на свежий соленый корм. Неформализованные повседневные наблюдения за

подопытными линиями показывают, что соленый корм становится привлекательным для дрозофил лишь по прошествии нескольких суток, когда на его поверхности развивается богатая дрожжевая микробиота, видимая невооруженным глазом как светлый налет (Dweck et al., 2013; Depetris-Chauvin et al., 2015; Billeter, Wolfner, 2018; Otárola-Jiménez et al., 2024). К этому времени из яиц, отложенных в первые дни, уже вывелись личинки, активность которых препятствует учету откладываемых яиц. Не исключено, что мухи Мсс в действительности откладывают на соленый корм не меньше яиц, чем Мс и Мн, но делают они это не в первые сутки после подачи свежего корма в боксы.

Таким образом, полученные результаты в целом согласуются с предположением о том, что мухи, культивируемые в пространственно гетерогенной среде (Мсс и Мкс), характеризуются более высокой приспособленностью к обоим типам неблагоприятного корма (С и К), а также к благоприятному корму Н, по сравнению с мухами, содержащимися в гомогенных условиях (Мн, Мс, Мк). Результаты сравнений 1 и 10 отражают разнородность возможных адаптивных ответов на культивирование на разных кормах, но при этом их вряд ли следует рассматривать как сильный аргумент против идеи о том, что пространственная гетерогенность среды может способствовать генерализации (Lynch, Gabriel, 1987; Weaver et al., 1999; Kassen, 2002; Hughes et al., 2007; Legros, Koella, 2010; Duncan et al., 2011; Ketola et al., 2013; Condon et al., 2014). Как было отмечено в параграфе 5 «Обзора литературы» влияние гетерогенной среды на эволюцию *D. melanogaster* изучали лишь в небольшом числе исследований, причем в основном делали акцент на временной гетерогенности (Condon et al., 2014; Huang et al., 2015; Joshi, Thompson, 1997; Le Vinh Thuy et al., 2016). Джоши и Томпсон (Joshi, Thompson, 1997) изучали выживаемость и время развития *D. melanogaster*, которые в течение 12 поколений жили либо на стандартном корме, либо с возможностью выбора между стандартным кормом и кормом с этанолом. Авторы обнаружили, что экспериментальные популяции *D. melanogaster*, демонстрировали высокую выживаемость на обоих типах корма, тогда как контрольные популяции,

которые развивались только на стандартной среде, демонстрировали низкую выживаемость на корме, обогащенном этанолом. Однако постановку этого эксперимента нельзя считать удачной для выявления роли гетерогенности среды в адаптации мух, так как в данном случае нельзя отличить результат адаптации к этанолу от результата адаптации в гетерогенных условиях. Роль гетерогенности в эволюции продолжительности жизни и плодовитости, по-видимому, не изучали ни на *D. melanogaster*, ни на других организмах, поэтому тестирование, проведенное в настоящем исследовании, может пролить свет на некоторые нюансы адаптациогенеза дрозофил в условиях пространственной гетерогенности. Стоит отметить, что пространственная гетерогенность повсюду встречается в природе и естественна для диких популяций дрозофил.

После завершения нашего исследования и выхода статьи в 2018 г. (Горшкова и др., 2018) в 2019 г. вышла статья Ванга и соавторов (Wang et al., 2019), наиболее близкая по смыслу и задачам к нашему исследованию. Исследовалась выживаемость личинок мух, адаптирующихся в течение примерно 190 поколений к корму с кадмием, корму с концентрацией соли, которая на момент исследования составляла 7,5%, или к гетерогенной среде двух типов – чередование корма с кадмием и солью (гетерогенная во времени среда) и смешивание мух-родителей с двух типов корма случайным образом в равных пропорциях и содержание на среде либо с солью, либо с кадмием (гетерогенная в пространстве среда, по мнению авторов). Выживаемость личинок была протестирована в 18 разных условиях, а дисперсия выживаемости рассматривалась в качестве маркера экологической специализации. Авторы получили, что популяции, адаптированная к кадмию оказалась более специализированной в экологическом плане, чем популяции, адаптированная к соленому корму. Степень специализации к двум гетерогенным средам дала примерно промежуточные результаты. Авторы утверждают, что постоянные среды иногда порождают крепких универсалов, которые могут выдерживать изменения.

Схожесть нашего и упомянутого исследования состоит в том, что в качестве

стрессового корма использовался соленый корм (причем даже в более высокой концентрации, 7,5%, чем в настоящем исследовании на момент начала тестирования, 5,5%). Изучается параметр жизненного цикла – выживаемость личинок, почти эквивалентный эффективности размножения в нашем исследовании. Существенными отличиями является то, что в настоящем исследовании мухи в действительности имели возможность выбора между средами, а не попадали на одну из сред случайно (что, на наш взгляд, не правомерно называть истинно пространственно гетерогенной средой). Второе отличие – отсутствие контрольной популяции, не живущей на стрессовом корме (в нашем исследовании такой контроль есть – это линия Мн, живущая на благоприятном стандартном корме). Плюсом исследования является тестирование мух через 190 поколений отбора, в нашем исследовании поколений было примерно в 5–10 раз меньше, однако за указанный период мухи адаптировались к соленому корму (Дмитриева и др., 2016).

В ответ на статью Ванга и соавторов (Wang et al., 2019) в том же журнале вышла статья Линскотта (Linscott, 2019), которая, по мнению авторов, дает истинную интерпретацию результатам Ванга и др., состоит она в том, что повышенную толерантность к разным условиям тестирования можно лучше всего объяснить как побочный продукт адаптации к крайне стрессовому корму с высокой концентрацией соли.

В нашем исследовании наблюдается качественно иной результат. Скорее всего, это можно объяснить принципиально другим дизайном гетерогенной среды в эволюционном эксперименте.

По-видимому, причины более успешной адаптации мух, культивируемых в пространственно гетерогенной среде, следует искать в характере отбора, действующего на мух в двойном боксе, разделенном перегородкой с отверстием на два отсека с разными типами неблагоприятного корма (С и К). Логично предположить, что личинки, выходящие из яиц, отложенных на корм К, подвергаются отбору на способность успешно развиваться на обедненном

крахмальном корме, тогда как в «соленом» отсеке личинки подвергаются отбору на способность выживать на соленом корме. То же относится и к имаго с той оговоркой, что у имаго есть возможность мигрировать между отсеками. Неформализованные наблюдения показывают, что имаго активно пользуются этой возможностью. В начале недельного цикла (сразу после подачи свежего корма) наблюдается переток подавляющего большинства мух в «крахмальный» отсек, тогда как к концу недельного цикла «крахмальный» отсек пустеет отчасти из-за гибели имаго, отчасти из-за миграции в «соленый» отсек. Это связано с тем, что крахмальный корм привлекателен для имаго в первые дни, но затем быстро теряет привлекательность и к концу недели становится практически непригодным для имаго (Яковлева и др., 2016). При этом личинки продолжают успешно развиваться в старом крахмальном корме, а еженедельный выплод имаго практически одинаков в обоих отсеках двойного бокса. При культивировании мух в гомогенных условиях на корме К (линия Мк) быстрая утрата крахмальным кормом пригодности для имаго проявляется в массовой гибели имаго к концу недельного цикла. В «крахмальном» отсеке двойного бокса часть имаго к концу недели тоже погибает, но часть мигрирует в «соленый» отсек. Соленый корм, напротив, наименее привлекателен для имаго в первые дни, а затем его привлекательность растет, что связано с размножением на поверхности корма дрожжевой микробиоты (Lebreton et al., 2017; Reisenman, Scott, 2019; Yakovleva et al., 2024; Яковлева и др., 2024).

Интересно, что культивирование на неблагоприятных кормах не только не вызвало сокращения ПЖ и сдвига репродукции на молодой возраст, но привело к противоположному результату, а именно к увеличению ПЖ и сдвигу репродукции на более поздний возраст по сравнению с контрольной линией Мн (рис. 9, 10). На первый взгляд это может показаться парадоксальным. Из двух кормов, находящихся в двойном боксе, один (К) в гомогенных условиях способствует сокращению ПЖ и ускоренному репродуктивному старению (Яковлева и др., 2016), а второй (С) не приводит к значимым изменениям ПЖ и возрастного распределения репродуктивного усилия (это показано в параграфе 1 данного

раздела). Казалось бы, следует ожидать, что адаптивным ответом на культивирование в двойном боксе на кормах К и С будет нечто среднее, то есть небольшое сокращение ПЖ и небольшой сдвиг репродукции в сторону более молодого возраста (как в исследовании (Wang et al., 2019)). Мы же наблюдаем противоположный результат. Чтобы понять возможную причину такого адаптивного ответа, сравним репродуктивные стратегии, которые были бы оптимальными для самки, прошедшей стадию личинки в пробирке с кормом К, в зависимости от того, находится ли эта пробирка в изолированном боксе, содержащем только этот тип корма, или в «крахмальном» отсеке двойного бокса. В первом случае самка с большой вероятностью погибнет в течение первой недели взрослой жизни. Поэтому наибольший репродуктивный успех будут иметь особи, которые отложат максимальное количество яиц в первые дни после выхода из куколки. Аллели, способствующие росту ранней плодовитости, будут поддерживаться отбором, даже если «платой» за такой рост станет резкое снижение жизнеспособности и плодовитости с возрастом (Williams, 1957). Во втором случае (в двойном боксе) у самки есть шанс избежать быстрой гибели, если она, отложив какое-то количество яиц в пробирки со свежим крахмальным кормом, перейдет затем в «соленый» отсек. Жизнь на соленом корме, очевидно, тоже вредит здоровью мух (сравним рис. 9, а, б и рис. 9, в, г), однако в двойном боксе у мух есть возможность уменьшить вредное воздействие соленого корма, иногда переходя в «крахмальный» отсек (особенно выгодно это делать в первые дни после подачи свежего корма, пока крахмальным корм еще пригоден для имаго). Иными словами, для мух из двойного бокса оптимальной репродуктивной стратегией, скорее всего, будет не максимизация раннего репродуктивного усилия любой ценой, а высокая миграционная активность, долгая жизнь и более равномерное распределение репродуктивного усилия во времени. Логично предположить, что подобная стратегия адаптивна и в природе. Возможно, это одна из причин космополитности вида *D. melanogaster*.

Возможности выбрать корм самостоятельно у мух в исследовании Ванга и

др. (Wang et al., 2019) не было – мух с двух кормов каждое поколение случайным образом смешивали в равных пропорциях и снова рассаживали по двум кормам, по-видимому, по этой причине результаты в двух исследованиях различаются.

Более успешная адаптация мух из двойного бокса (Мсс и Мкс) отчасти может быть связана также с более высокой эффективной численностью популяции по сравнению с линиями Мс и Мк. Численность популяций в нашем эксперименте не контролируется и мухам предоставляется возможность поддерживать ее на том уровне, который диктуется «несущей способностью» экспериментальных боксов. Однако этим нельзя объяснить более высокие показатели приспособленности, продемонстрированные мухами из двойного бокса по сравнению с мухами Мн в сравнениях 2–9, потому что численность популяции двойного бокса в течение эволюционного эксперимента всегда была намного ниже, чем в линии Мн. Поэтому мы предполагаем, что различия в эффективной численности популяций вряд ли внесли большой вклад в обнаруженные различия по показателям приспособленности.

2.2. Возможность специализации или генерализации в ходе отбора

Полученные в данных тестах результаты согласуются с предположением о том, что мухи, культивируемые в гетерогенной среде, лучше адаптированы к кормам С (сравнения 2, 3, 6, 8 из пункта 2.1), К (сравнение 4) и Н (сравнения 1, 5, 7), чем линии, культивируемые в гомогенной среде. Условия содержания мух в двойном боксе предполагают, что отбор должен способствовать росту частоты встречаемости аллелей, повышающих приспособленность к кормам С и К. Эти аллели могут присутствовать как у одних и тех же мух, так и у разных. В первом случае можно говорить о генерализации (мухи адаптировались одновременно к двум неблагоприятным кормам), во втором – о специализации и диверсификации (одни мухи лучше приспособились к корму С, другие – к корму К), по этой причине дисперсия исследуемого признака – удобный способ измерения уровня специализации (к примеру в исследовании (Wang et al., 2019)).

Имеющиеся данные свидетельствуют скорее в пользу генерализации. Если бы популяция двойного бокса представляла собой смесь мух, приспособленных либо к соли, либо к крахмалу, то в тестах на эффективность размножения на кормах С и К линии Мсс и Мкс должны были бы продемонстрировать больший разброс числа потомков, чем линии Мс и Мн. В действительности наблюдается противоположная картина. Так, в сравнении 2 (корм С) значения коэффициента вариации для линий Мн, Мс, Мсс, Мкс составили 60,5, 87,1, 41,7 и 35,2 соответственно; в сравнении 4 (корм К) соответствующие значения составляют 24,0, 46,6, 34,7, 39,0. Таким образом, мы видим, что в обоих случаях в линии Мс разброс числа потомков (то есть изменчивость мух по эффективности размножения на данном корме) существенно выше, чем в линиях Мсс и Мкс. Это противоречит предположению о том, что в двойном боксе обитает смесь мух, из которых одни лучше адаптированы к соли, а другие к крахмалу. Кроме того, имеет место постоянная миграция мух между отсеками двойного бокса, что согласуется с предположением о единстве обитающей там популяции.

Таким образом, полученные результаты в целом согласуются с гипотезой о том, что пространственная гетерогенность среды может способствовать генерализации (выработке разносторонних адаптаций) без существенной потери конкурентоспособности в каждой конкретной среде. Это соответствует представлению о «низкой стоимости» генерализации. Ранее в нескольких эволюционных экспериментах было показано, что генерализация может быть эволюционным ответом на временную гетерогенность среды, то есть на изменчивость условий во времени (Kassen, Bell, 1998; Weaver et al., 1999; Hughes et al., 2007; Duncan et al., 2011; Ketola et al., 2013; Condon et al., 2014). Наши данные позволяют заключить, что пространственная гетерогенность среды может иметь аналогичные эволюционные последствия.

Можно предположить, что вероятность того, пойдет ли эволюция в гетерогенных условиях по пути специализации (диверсификации) или генерализации, во многом зависит от генетической архитектуры соответствующих

адаптаций и особенностей среды, к которой организм адаптируется («заложенная» генетически способность организма адаптироваться к условиям среды) (Ackermann, Doebele, 2004). Ключевую роль здесь должно играть наличие или отсутствие антагонистической плейотропии аллелей, влияющих на приспособленность к разным неблагоприятным факторам среды (например, к кормам К и С). Антагонистическая плейотропия, порождая «эволюционные компромиссы», должна способствовать специализации и снижать вероятность генерализации, повышая ее «стоимость» (Kassen, 2002; Remold, 2012). Не исключено, что эврибионтные виды, такие как *D. melanogaster*, потому и стали эврибионтными, что адаптация к новым условиям часто дается им относительно «дешево», не приводя к побочным эффектам в виде снижения приспособленности к иным условиям, адаптация к которым была выработана ранее (Дмитриева и др., 2016).

2.3. Возможный вклад симбиотической микробиоты в адаптацию к соли

В свете рассмотренных данных представляется особенно интересным, что в тестах на эффективность размножения на соленых кормах (сравнения 2, 3 из пункта 2.1) линия Мсс показала лучшие результаты, чем линия Мкс (на корме с 4% соли различие статистически значимо, на корме с 5,5% соли – проявляется в виде тенденции; рис. 8, б, г). Если приведенные выше соображения о генерализации и единстве популяции двойного бокса верны, то более высокая приспособленность мух Мсс к соленым кормам по сравнению с мухами Мкс должна объясняться негенетическими факторами (Марков, Ивницкий, 2016). Мы предполагаем, что это так и есть, и что в роли негенетического фактора, способствующего эффективному размножению мух Мсс на соленом корме, выступает симбиотическая микробиота, переносимая мухами на поверхности тела и (или) в кишечнике, аналогично соображениям, описанным в пункте 1.2 данного раздела, посвященным адаптации линии Мс к корму С. Поэтому мы предполагаем, что повышенная эффективность размножения мух Мсс на соленых кормах по сравнению с мухами Мкс объясняется

тем, что мухи Мсс, происходящие из «соленого» отсека двойного бокса, несут на поверхности тела или в кишечнике больше адаптированных к соли микроорганизмов, чем мухи Мкс. Непосредственно микробиота мух из двойных боксов пока не изучалась, но влияние микробиоты и отдельных ее компонентов на различные аспекты жизни мух на всех стадиях развития хорошо изучены и более подробно обсуждаются далее.

3. Влияние дрожжевой микробиоты и отдельных ее компонентов на параметры жизненного цикла дрозофил

3.1. Роль дрожжей в развитии *D. melanogaster*

Параметры жизненного цикла преимагинальных стадий развития *D. melanogaster* находятся за рамками настоящего исследования. Однако стоит упомянуть, что насекомые, в отличие от позвоночных, как правило, не способны синтезировать стеролы *de novo*, поэтому они должны получать их с пищей. Грибы, в частности дрожжи, являются источником C₂₈ стеролов, например, эргостерола, необходимых для синтеза стероидных гормонов членистоногих, которые выступают ключевыми регуляторами системы межорганных взаимодействий, запускающей линьку и контролирующей рост, обмен веществ и плодовитость (Lavrynenko et al., 2015).

Несмотря на то, что дрожжевая микробиота мух Мбд значительно обеднена согласно нашим результатам посевов, не зафиксировано каких-либо нарушений развития мух из этой линии, а популяция составляет тысячи особей и стабильно воспроизводится. Это позволяет предположить, что доступность пищевых стеролов остаётся достаточной для нормального развития личинки. Во-первых, это связано с тем, что неживые, термически обработанные, дрожжи, входящие в рецепт корма, могут быть источником необходимых веществ. В частности показано, что аксенические мухи проходят метаморфоз на корме без живых дрожжей, хоть и чуть медленнее, чем мухи в присутствии естественной микробиоты (Jiménez-Padilla et al., 2024). Также показано, что эргостерол оказывается весьма устойчив и долго

сохраняется в составе мертвых грибов (Mille-Lindblom et al., 2004), это согласуются с предположением о сохранении части эргостерола после термической обработки. Во-вторых, наши эксперименты показывают, что в линии Мбд на корме с подсевом живых дрожжей размножаются не только подсеянные дрожжи, но и дрожжи *P. occidentalis*, характерные для линии Мн, предковой по отношению к Мбд (см. пункт 3.4 раздела «Результаты» и пункт 3.3 настоящего раздела). Это наблюдение допускает возможность сохранения дрожжевых клеток в линии Мбд, несмотря на присутствие нистатина. Если такие клетки сохраняются у мух и способны возобновлять рост, они также могут служить источником пищевых стеролов.

3.2. Взаимосвязь между диетой, продолжительностью жизни и динамикой плодовитости

Во многих исследованиях показано, что снижение бактериальной нагрузки, в том числе путем добавление в корм антибиотиков, или уменьшение количества живых пекарских дрожжей в корме продлевает жизнь дрозофилам (Chippindale et al., 1993; Gould et al., 2018; Lee et al., 2019; Walters et al., 2020; Yamada et al., 2015; Osborne, Dearden, 2017; Klepsatel et al., 2018; Keebaugh et al., 2019; Lewis, Hamby, 2019; Murgier et al., 2019). Полученные нами результаты в тестах с подсевами дрожжевой микробиоты (Тесты 9–10) во многом схожи по тенденциям с литературными данными: наибольшую ПЖ имеют мухи Мбд с обедненной дрожжевой микробиотой, тестируемые на корме без привнесения дрожжей (Мбд на Н). Такие мухи в среднем живут дольше, чем мухи той же линии (Мбд) на корме с подсевами дрожжей, и дольше, чем мухи Мн, сохраняющие свою естественную микробиоту.

Подсев дрожжей на корм в дополнение к естественной дрожжевой микробиоте может как понизить среднюю ПЖ мух, так и оставить ее неизменной. В линии Мн только подсевы «чужеродных» для нее дрожжей *S. bacillaris* и *S. cerevisiae* (не встречающихся в микробиоме мух, живущих на стандартном корме) значительно сокращают среднюю ПЖ (на 6,9 и 8,5 дней соответственно).

Подсев дрожжей *Z. bailii* не снизил значимо ПЖ в линии Мн. Дрожжи *Z. bailii* встречаются и даже являются массовым в некоторых репликах линий мух, содержащихся на стандартном корме Н (Dmitrieva et al., 2019).

В используемой в настоящем исследовании линии Мн дрожжи *Z. bailii* не обнаружены, по крайней мере на момент проведения тестирования (см. результаты Теста 10 в п. 3.4), но тот факт, что подсев только данного вида дрожжей не снижает ПЖ мух Мн, может свидетельствовать о неслучайности дрожжевой компоненты микробиоты дрозофил. Литературные данные свидетельствуют, что состав и структура микробиоты очень вариабельны и зависят от условий жизни мух, в том числе от их диеты (Broderick, Lemaitre, 2012; Wong et al., 2013; Walters et al., 2020; Yakovleva et al., 2024), но длительные взаимосвязи микроорганизма и хозяина, по-видимому, образуются, причем это выгодно участникам «союза» (Charroux, Royet, 2012; Erkosar et al., 2013; Obadia et al., 2017; Sannino et al., 2018; Pais et al., 2018; Vandehoef et al., 2020). Это согласуется с результатами исследований, в которых показано, что дрозофилы могут влиять на состав своего микробного сообщества (Starmer et al., 1990; Stamps et al., 2012).

Из всех видов дрожжей, подсеваемых на корм в настоящем исследовании, только влияние живых пекарских дрожжей на параметры жизненного цикла было изучено ранее. Присутствие живых дрожжей *S. cerevisiae* в корме влияло на размер и плодовитость дрозофил, значительно увеличивало скорость их развития, но снижало ПЖ (Lewis, Hamby, 2019; Murgier et al., 2019). В исследованиях под руководством Калебиной Т.С. с кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ показано, что белки с амилоидными свойствами, входящие в состав клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae*, могут быть индукторами развития системных амилоидозов у мышей (Рекстина и др., 2016; Калебина и др., 2021). Некоторые из веществ-промоуторов амилоидозов, поступаая с кормом, могут на начальном этапе заметно увеличивать двигательную активность мух, но впоследствии сокращают их активность и ПЖ (Pokrzywa et al., 2017). Это согласуется с наблюдаемыми нами результатами: подсев дрожжей *S. cerevisiae* на

корм существенно сокращает ПЖ мух (в особенности самцов) и смещает репродукцию самок на более ранний возраст (особенно в линии Мн) (рис. 12–14).

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что дрожжевая микробиота, как подсеянная на корм, так и естественная (находящаяся на поверхности тела и в кишечнике мух Мн), сокращает среднюю ПЖ дрозофил. У самцов этот эффект проявляется сильнее, чем у самок (рис. 12, б, в). Любая дрожжевая микробиота сокращает жизнь самцов примерно на треть, но дополнительная микробиота (подсеянная на корм) снижает ПЖ самцов Мн, только если данный вид дрожжей не встречается в составе естественной микробиоты мух, живущих в стандартных условиях (то есть отличен от *Z. bailii*, рис. 12, б). Средняя ПЖ самок также снижается в присутствии дрожжевой микробиоты, но эффект не такой сильный, как для самцов. ПЖ самок в самом «худшем случае» (в присутствии своей микробиоты и подсева пекарских дрожжей) сокращается менее чем на 20% по сравнению с самыми долгоживущими самками Мбд, тестируемыми на корме без подсева. Это согласуется с высказанным не раз выше предположением, что генетический базис ПЖ у самцов и самок различается.

Гулд и коллеги (Gould et al., 2018) наблюдали значительное превышение ПЖ мух, лишенных бактериальной микробиоты, по сравнению с ПЖ мух, которым на корм подсеивали их микробиоту или отдельные ее компоненты. В попытках объяснить полученные результаты Гулд с коллегами предположили, что наблюдаемое сокращение ПЖ мух при засеивании корма компонентами бактериальной микробиоты может быть обусловлено прямым вредом, наносимым бактериями хозяину: потребление питательных веществ, выделение токсичных метаболитов, вызывающих у хозяина иммунный ответ (Rolig et al., 2015), или нанесение физического повреждения клеткам хозяина бактериальными системами секреции, как показали Фаст с коллегами (Fast et al., 2018). Причем на среднюю ПЖ самцов и самок изменения в бактериальной микробиоте оказывают сходное влияние. Однако вряд ли такое объяснение подойдет для нашего случая с дрожжевой микробиотой. Ведь дрожжи являются одним из важнейших источников питания

мух на личиночной и имагинальных стадиях жизненного цикла (Cooper, 1960; Begon, 1982; Anagnostou et al., 2010; Mure et al., 2023). Также нами показано, что сила влияния дрожжей на среднюю ПЖ для самцов и самок (особенно из линии Мбд) различается.

В эксперименте Чиппиндейла с коллегами (Chippindale et al., 1993) мух не лишали дрожжевой микробиоты, а лишь варьировали объем доступных живых пекарских дрожжей в корме. Эксперимент показал увеличение средней ПЖ мух в линиях, тестируемых на корме, засеянном наименьшим количеством живых дрожжей. По-видимому, в нашем тесте, так же, как и в тесте Чиппиндейла, умеренная дрожжевая диета продлевает жизнь мухам обоих полов, например, путем снижения окислительного стресса, через понижение уровня инсулина и/или инсулиноподобного фактора роста (IGF) и подавления сигнального пути TOR и т.д. (Zheng et al., 2005; Partridge et al., 2011; Tatar et al., 2014).

Нельзя исключать, что на ПЖ может повлиять консистенция корма, ведь корм, засеянный живыми дрожжами, значительно более липкий, чем незасеянный. Такую гипотезу рассматривали Чиппиндейл с коллегами (Chippindale et al., 1993), но не нашел ей статистического подтверждения. В нашем тесте корм, засеянный дрожжами, был липким, но большей смертности от прилипания мух в корму визуально отмечено не было. Именно для исключения подобных недоразумений в бокс ставилась чашка с кормом Н без подсева, чтобы у мух в доступе всегда была пища, даже если корм с дрожжами изначально оказался бы для них ненадлежащей консистенции.

Природа различной «чувствительности» ПЖ самцов и самок к присутствию дрожжевой микробиоты находится в самом начале своего изучения. Известно, что белки, источником которых для мух являются дрожжи, – не просто пища, но и «строительный материал» для формирования половых продуктов. Можно предположить, что с этим связан наблюдаемый половой диморфизм: часть энергии и питательных веществ от потребляемых дрожжей самка тратит на формирование яиц, поэтому та часть пищи, которую самка расходует на другие метаболические

процессы, меньше, чем у самцов, не формирующих «дорогостоящие» яйца. Подобный эффект на плодовитость самок показан в экспериментах на кормах с разным содержанием (неживых) дрожжей (Duxbury, Chapman, 2019), вероятно, подсев живых дрожжей на корм может иметь тот же эффект.

Учет плодовитости самок показал, что дрожжи способствуют, во-первых, более интенсивной откладке яиц на свежий корм, во-вторых – сдвигу репродукции на более ранний возраст и ускоренному репродуктивному старению. Это справедливо как для естественной дрожжевой микробиоты мух (сравнение Мбд на корме Н с Мн на корме Н), так и для вариантов с подсевами дрожжей на корм, причем подсев дрожжей на корм сглаживает различия по плодовитости между линиями с естественной и обедненной дрожжевой микробиотой (рис. 14).

Добавление дрожжевой микробиоты к своей естественной микробиоте приводит к росту плодовитости или по меньшей мере не снижает ее (как в варианте Мн+S.c, рис. 14). Повышение общей плодовитости выражено у мух в присутствии *S. bacillaris* и *Z. bailii*. Сдвиг репродукции на ранний возраст и ускоренное репродуктивное старение сильнее выражены в присутствии *S. cerevisiae*, чем в присутствии *S. bacillaris* и *Z. bailii* (рис. 14).

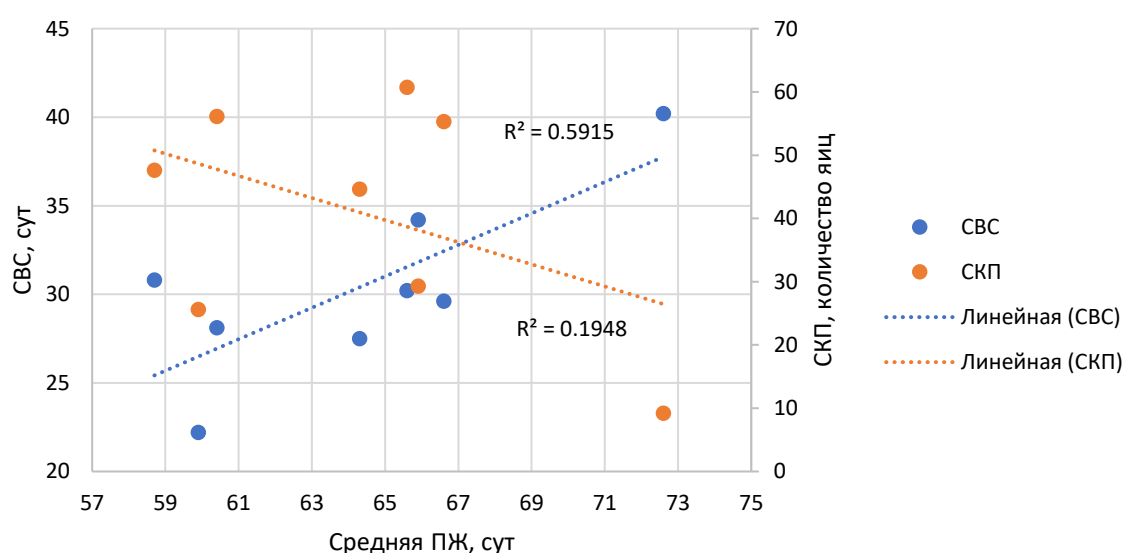


Рисунок 20. Взаимосвязь средней ПЖ со средним возрастом самки, откладывающей яйца (CVC) и суммарным коэффициентом плодовитости (СКП). Каждая точка на рисунке соответствует одному варианту в Тестах 9 (по оси абсцисс) и 10 (по оси ординат).

Между средней ПЖ самок и средним возрастом самки, откладывающей яйца, (СВС) наблюдается значимая положительная взаимосвязь ($p < 0,03$): у самок, живущих дольше, репродуктивное старение замедлено, репродукция смещена на более поздний возраст, и, как правило, увеличен возраст, когда самка еще откладывает яйца, по сравнению с самками, имеющими более низкую ПЖ (рис. 14, 20).

При этом нет четкой обратной зависимости между ПЖ и суммарной плодовитостью (СКП) ($p = 0,274$), это означает, что связь между двумя данными показателями объясняется эволюционным компромиссом не полностью, и есть еще недоучтенные факторы (рис. 20). Одним из таких факторов может быть бактериальный компонент симбиотической микробиоты, оказывающий влияние на мух и дрожжи. Данный вопрос требует дополнительного исследования.

3.3. Роль дрозофил в поддержании симбиотического дрожжевого сообщества

Изучение состава дрожжевого сообщества (Тест 11), которое развивается в боксах мух, тестируемых на ПЖ и плодовитость (Тесты 9 и 10) в присутствии разных видов дрожжей, по-видимому, является еще одним подтверждением того, что между дрозофилами и дрожжами также могут формироваться устойчивые, специфические связи (Charroux, Royet, 2012; Erkosar et al., 2013; Obadia et al., 2017; Sannino et al., 2018; Pais et al., 2018; Vandehoef et al., 2020). Один из интересных результатов состоит в том, что в вариантах теста, где мухи Мбд жили на корме с подсевом живых дрожжей, обнаружен не только вид дрожжей, внесенный на корм, но и дрожжи *P. occidentalis*, типичные для предковой линии Мн (рис. 15, в, д, ж). Однако они не обнаружены в посевах гомогенатов мух Мбд перед началом тестирования (Тест 8; рис. 11, б) и не высеваются из бокса, где мухи Мбд тестируются на корме Н без подсева. Повторение данного результата в трех боксах с подсевом различных видов дрожжей, во-первых, исключает возможность контаминации, во-вторых, позволяет с большой вероятностью утверждать, что на

поверхности тела и/или в кишечнике мух Мбд (полученных из линии Мн путем содержания на корме с фунгистатическим препаратом) могут сохраняться клетки дрожжей *P. occidentalis* в малоактивном состоянии. Жизнь на корме Н, не содержащем жизнеспособных дрожжей, не приводит к активации их роста. Тогда как жизнь на корме Н с подсевом какого-либо вида живых дрожжей приводит к их активации, причем настолько, что за три дня они становятся доминирующими в боксах Мбд+S.b (56%) и Мбд+S.c (94%), а в боксе Мбд+Z.b их доля в дрожжевом сообществе, развивающемся на корме, составляет более трети (около 35%). Подобные взаимоотношения (индукция роста одних видов в присутствии других) часто наблюдаются у прокариот (Epstein, 2013; Harcombe et al., 2018), но аналогичные взаимовлияния у эукариот изучены слабо; для дрожжей, использующихся в виноделии, показано, что одни виды дрожжей могут как усиливать, так и подавлять рост других (Pourcelot et al., 2023). В предыдущих исследованиях нашей кафедры было показано, что дрожжи *P. occidentalis* являются постоянным компонентом кишечной микробиоты дрозофил разных лабораторных линий (Dmitrieva et al., 2019; Дмитриева и др., 2022), а в литературе часто встречаются сведения об обнаружении этого вида дрожжей как непосредственно на дрозофилах и в их экскрементах, так и на плодах или других часто посещаемых дрозофилами субстратах (Hedrick, Burke, 1951; Barker et al., 1984; Morais et al., 1995; Trindade et al., 2002; Starmer et al., 2003; Arroyo-López et al., 2006).

Дрожжевое сообщество, формирующееся за три дня на освоенном мухами корме, может указывать на то, насколько тот или иной вид дрожжей присущ дрозофилам. Так как дрожжи *Z. bailii* встречаются в линиях Мн, то, скорее всего, они коэволюционировали вместе с мухами данной линии и хорошо приспособлены к жизни в их дрожжевом сообществе (данный вид дрожжей составляет 65% дрожжевого микробиома в варианте теста Мбд+Z.b); вид *S. bacillaris* редко обнаруживается у мух линии Мн, но встречается в нашем эволюционном эксперименте в линии дрозофил, адаптирующихся к корму с повышенным содержанием соли, поэтому его доля в дрожжевом сообществе в боксе Мбд+S.b

составляет чуть меньше половины (44%); *S. cerevisiae* крайне редко встречается у дрозофил (Hoang et al., 2015) и не встречается у мух в нашем эволюционном эксперименте, возможно, поэтому данный вид не адаптирован к жизни в мушином дрожжевом сообществе и его доля в варианте теста Мбд+S.c составила всего 6%. Однако в вариантах теста с мухами Мн доли рассматриваемых видов дрожжей в сложившемся на корме сообществе иные. Скорее всего, это обусловлено влиянием естественного микробиома мух Мн на подсеянные дрожжи. Этот вопрос уходит в плоскость взаимодействия между видами и штаммами дрожжей в зависимости от исходного соотношения их численности и пока остается за рамками данного исследования.

На основе структуры дрожжевых сообществ в линии Мбд (рис. 15, в, д, ж) и сопоставления ее со структурой сообществ для линии Мн (рис. 15, а, б, г, е), можно предположить, что наличие дрожжей любого из трех видов достаточно для активации роста дрожжей *P. occidentalis*. Далее то, в каком соотношении будут представлены дрожжи различных видов на корме, зависит и от изначально засеянного на него вида дрожжей, и от взаимодействия между видами дрожжей, и от самой мухи (с ее исходной микробиотой).

Другая гипотеза, объясняющая появление дрожжей *P. occidentalis* в боксах «линия Мбд + подсев», связана с взаимодействием дрожжевого и бактериального компонентов микробиоты. Возможно, в линии мух Мбд, культивируемой на корме с нистатином, бактерии при ослаблении конкуренции с дрожжами развиваются активнее, и не дают отдельным оставшимся клеткам дрожжей размножаться в варианте теста Мбд на Н без подсева. В присутствии же подсеянных дрожжей, возможно, образуется спирт, часть чувствительных к нему бактерий погибает, и единичные клетки дрожжей, оставшихся на поверхности тела и/или в кишечнике мух Мбд, приобретают возможность расти и размножаться. Так, известно, что многие дрожжи способны сбраживать сахар даже в аэробных условиях (эффект Кребтри), данный процесс хоть и является энергетически менее выгодным, но сопровождается образованием спирта, повышением температуры и выделением

углекислого газа, что может приводить к подавлению бактерий (Thomson et al., 2005; Piškur et al., 2006; Goddard, 2008).

Также стоит принять во внимание, что нистатин является препаратом актиномицетного происхождения и подавляет рост грибов, в том числе дрожжевых (Shapiro, 2023). Механизм действия данного препарата основан на разрушении клеточных мембран, тогда как *P. occidentalis* является аскоспоровым видом дрожжей (Kurtzman, 2011), и, вероятно, его аскоспоры в меньшей степени подвержены воздействию данного антибиотика, чем вегетативные клетки, и в его отсутствии способны дать начало размножению дрожжей, сохранившихся в виде спор.

4. Вклад генетического, социального и микробиологического факторов в увеличение продолжительности жизни дрозифил, отбираемых на позднее размножение

Во всех трех тестах (Тесты 12-14) ПЖ мух из линии Ма, отбираемой на позднее размножение, оказалась намного больше, чем ПЖ мух из линии Мн, являющейся предковой к Ма и не подвергавшейся искусственному отбору (табл. 4; табл. 6, сравнение 1-2; табл. 8, сравнение 1). По умолчанию считается, что изменение признака, находящего под отбором, происходит за счет роста частоты аллелей, связанных с предпочитаемым фенотипическим проявлением данного признака (Rose, Charlesworth, 1981; Rose, 1984a; Mueller, 1987; Luckinbill et al., 1984; Luckinbill, Clare, 1985; Partridge, Fowler, 1992). Однако, сопоставляя ПЖ трех родственных лабораторных линий дрозифил в разных ситуациях, удалось показать, что увеличение ПЖ мух в линии, находящейся под отбором, нельзя объяснить только генетическими факторами. На такой сложный признак, как ПЖ, очевидно, влияют и другие факторы. Вклад некоторых из них в изменение ПЖ мы протестировали.

4.1. Социальные факторы (связанные с половым поведением)

В ряде исследований показано, что агрессивные ухаживания и конкуренция между самцами негативно сказываются на ПЖ самок (Fowler, Partridge, 1989; Chapman et al., 1995; Sirot et al., 2011; Carazo et al., 2014; Billeter et al., 2018; Verma et al., 2024). В состав семенной жидкости самцов входят вещества, влияющие на физиологию и поведение самок, делая их менее привлекательными для других самцов и менее склонными к повторному спариванию, причем эти вещества могут негативно сказываться на здоровье самок (Sirot et al., 2011; Billeter et al., 2018). По-видимому, именно по этим причинам мы наблюдаем значимое сокращение медианной продолжительности жизни самок из линии Мн (на 9%) и самок из линии Ма (на 18%) при совместном проживании с самцами из чужой для них линии (Мбд) (Тест 13). Тот факт, что именно половое поведение самцов (а не, например, микробиота мух Мбд) повлияло на ПЖ самок, подтверждается тем, что сожительство самцов как из линии Мн, так и из линии Ма с чужими самками из линии Мбд не привело к значимому изменению ПЖ самцов (табл. 6, сравнения 9 и 11).

Можно предположить, что сокращение ПЖ самок в обеих тестируемых линиях, живших с самцами Мбд, связано с большей активностью самцов Мбд по сравнению с самцами Ма и Мн. Линия Мбд культивируется на нистатиновом корме Бд и характеризуется обедненным дрожжевым микробиомом. Известно, что самки, живущие на корме с обедненной микробиотой, откладывают меньше яиц (Gould et al., 2018), поэтому самцам в линии Мбд может быть особенно выгодно проявлять бóльшую активность, чтобы спариться с бóльшим числом самок и оставить больше потомства. С другой стороны, ПЖ самок в результате жизни с чужими партнерами, вне зависимости от их активности, может сокращаться по той причине, что самки не адаптированы к вредным веществам, содержащимся в семенной жидкости самцов (тогда как негативный эффект от веществ, содержащихся в семенной жидкости самцов из своей линии, сглаживается выработавшимися защитными адаптациями) (Friberg, 2005; Nandy et al., 2013; Filice, Long, 2016).

4.2. Микробиологические факторы

Подробный анализ литературных данных, проведенный в параграфе 8 «Обзора литературы», выявил, что микробиота, как бактериальная, так и дрожжевая оказывает существенное влияние на ПЖ дрософил и другие параметры жизненного цикла. Причем сила и направленность этого влияние опосредована другими факторами, к примеру питательностью корма, генетическими особенностями мух и т. д. (Starmer, 1981; Starmer et al., 1986; Chippindale et al., 1993; Brummel et al., 2004; Ren et al., 2007; Anagnostou et al., 2010; Дмитриева и др., 2016; Панченко и др., 2017; Ивницкий и др., 2018; Gould et al., 2018; Fast et al., 2018; Klepsatel et al., 2018; Dmitrieva et al., 2019; Walters et al., 2020; Yamashita et al., 2021; Lee et al., 2022; Arias-Rojas, Iatsenko, 2022; Zhang et al., 2023).

Оказалось, микробиологические факторы могут также участвовать в формировании различий по ПЖ между популяциями в ходе отбора организма хозяина. В пользу этого свидетельствуют результаты теста на совместное проживание дрософил из разных линий и теста на самках (Тесты 13 и 14).

В тесте на совместное проживание (Тест 13) удалось показать, что ПЖ – «заразный» признак: мухи Мбд не обладают микробиотой, влияющей на ПЖ мух Ма и Мбд, но ПЖ самок и самцов Мбд различается двукратно в зависимости от того, принадлежат ли их партнеры к линии Ма или линии Мн. Это можно объяснить тем, что либо мухи Мн «заражают» своих партнеров склонностью к короткой жизни, либо, наоборот, мухи Ма обладают «заразным» долголетием. Прояснить ситуацию удалось в последующем тестировании (Тест 14).

В тесте на самках, чтобы получить мух с обедненной собственной микробиотой, мы воспользовались фактом, что имаго дрософил приобретают свою микробиоту в основном после метаморфоза из субстрата (а не «наследуют» от личинки). Хотя существуют методики получения полностью безмикробных дрософил и такие насекомые в принципе жизнеспособны в благоприятных условиях (Koyle et al., 2016), изучение параметров жизненного цикла, как правило, ведется не на них, а на дрософилах с микробиотой, обычно не контролируемой (а

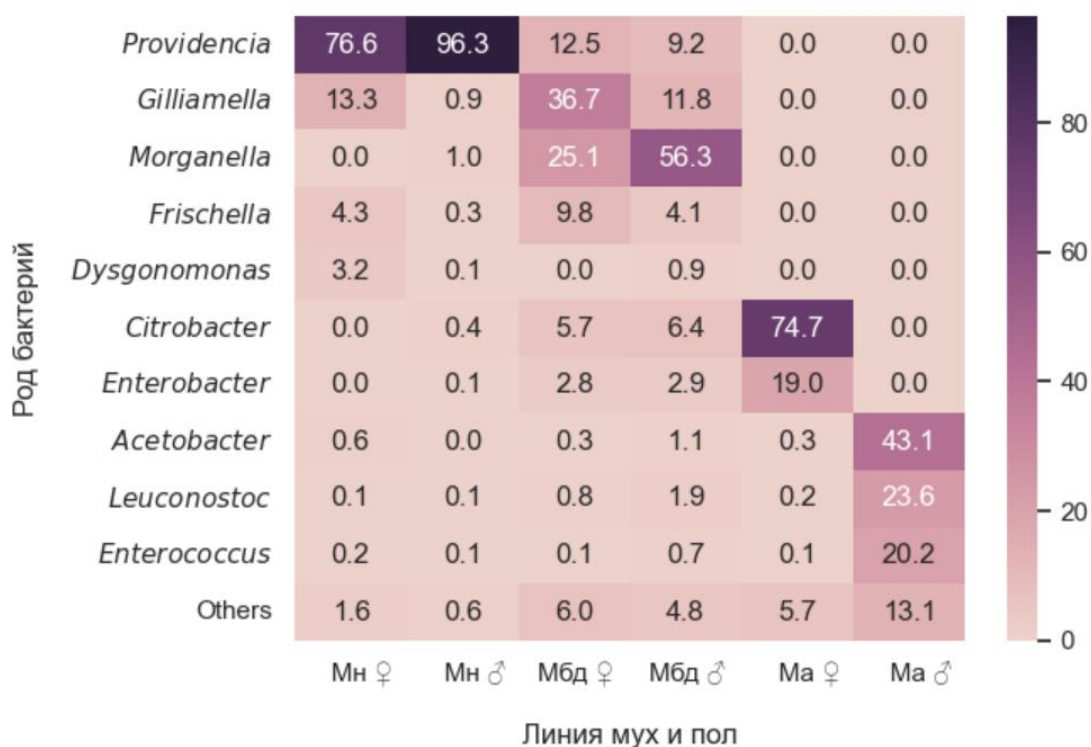
чаще всего просто игнорируемой) в ходе экспериментов. Отчасти это связано с трудностью строгого контроля микробиоты (или проведения всего эксперимента на безмикробных мухах в стерильных условиях), а отчасти с тем, что безмикробная муха – довольно-таки неестественный модельный объект, в природе не существующий. К тому же, теоретически, отсутствие микробов само по себе может сильно повлиять на то, как другие факторы будут сказываться на изучаемых параметрах жизненного цикла (этот аспект обсуждается в параграфе 8 «Обзора литературы»).

В тесте на самках (Тест 14) удалось показать, что мухи из линий Ма и Мбд живут в присутствии микробиоты Мн значительно меньше, чем в присутствии своей микробиоты. Мухи Мбд в присутствии микробиоты Ма живут столько же, сколько на своей микробиоте. Мухи Мн живут на микробиоте Ма дольше, чем на своей, но на своей микробиоте они живут значительно дольше, чем мухи из двух других линий. Эти факты, по-видимому, означают, во-первых, что микробиота Ма сама по себе жизнь не продлевает, а во-вторых, в микробиоте мух Мн присутствуют компоненты (бактерии или дрожжи), сильно сокращающие жизнь мух, поэтому малая ПЖ мух Мн «заразна».

Тот факт, что на микробиоте Мн мухи Мн живут дольше, чем мухи других линий, согласуется с предположением о том, что мухи Мн адаптировались к негативному влиянию своей микробиоты. То, что самки Мн на микробиоте Ма живут дольше, чем на микробиоте Мн, вероятно, означает, что эта адаптация неполна и микробиота Мн сокращает жизнь мухам из всех трех линий, включая линию Мн.

Безусловно, тесты, основанные на горизонтальной передаче микробиоты от одних мух к другим, не лишены недостатков: с их помощью мы пока не можем сказать, какие компоненты микробиома мух Мн приводят к сокращению ПЖ и как они действуют. Однако по нашим предварительным данным существуют значительные отличия в составе и структуре бактериальной и дрожжевой микробиоты исследуемых линий (рис. 21), а выяснение того, какие из них вносят вклад в наблюдаемые изменения по ПЖ – предмет дальнейших исследований.

а



б

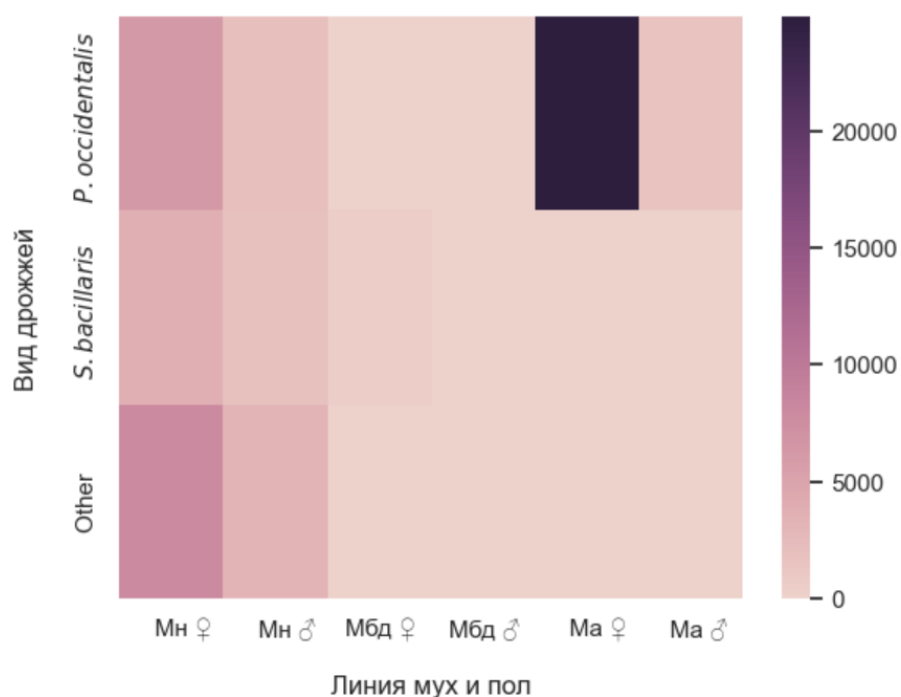


Рисунок 21. Состав и структура бактериальной (а) и дрожжевой (б) микробиоты самцов и самок мух из линий Мн, Мбд и Ма. На рис. (а) тепловая карта отражает процент представителей того или иного рода бактерий, указанный по вертикали, в линии, обозначенной по горизонтали; данные получены путем ДНК-профилирования. На рис. (б) тепловая карта отражает КОЕ дрожжей в расчете на одну муху; данные получены путем посевов (аналогично Тестам 8 и 11).

4.3. Генетические факторы

Результаты теста на совместное проживание (Тест 13) показывают, что трудно отделить влияние генетического фактора от вклада микробиоты в наблюдаемые различия по ПЖ мух из линий Мн и Ма. Влияние генетического фактора можно было бы считать достоверно ненулевым, если бы мухи из линии Ма имели повышенную ПЖ по сравнению с обеими линиями, не подвергавшимися искусственному отбору (Мн и Мбд). Мы наблюдаем значительное (до 2,5 раз) превышение ПЖ мух из линии Ма над ПЖ мух из линии Мн, однако сильная изменчивость ПЖ мух Мбд при смене линии сожителей указывает на то, что эти различия в значительной степени объясняются особенностями микробиоты линии Мн (табл. 5–6).

Сопоставление ПЖ для самцов и самок из линий Мбд и Ма, которые жили с партнерами из противоположной линии (табл. 6, сравнения 17–18) показало, что самцы в линии Ма живут значимо дольше самцов Мбд, причем это, по-видимому, не связано ни с самками, ни с микробиотой. Это согласуется с гипотезой об эффективности отбора на долголетие (Rose, Charlesworth, 1981; Rose, 1984a; Mueller, 1987; Luckinbill et al., 1984; Luckinbill, Clare, 1985; Partridge, Fowler, 1992). Однако ПЖ самок Мбд и Ма (живущих с чужими партнерами) значимо не различается. Это не значит, что отбор на долголетие не был эффективен, а, скорее, указывает на то, что самцы Ма досаждают своими ухаживаниями самкам Мбд меньше, чем самцы Мбд – самкам Ма (и в результате жизнь самок Ма сокращается) (Fowler, Partridge, 1989; Chapman et al., 1995; Sirot et al., 2011; Carazo et al., 2014; Billeter et al., 2018; Verma et al., 2024). Иными словами, результаты, полученные в ходе тестирования на совместное проживание, не доказывают отсутствия генетической компоненты в наблюдаемом увеличении ПЖ мух линии Ма, а лишь не позволяют вычленить ее в явном виде.

Дизайн теста на самках (Тест 14) в первую очередь ориентирован на то, чтобы выявить роль микробиоты в наблюдаемом изменении ПЖ мух Ма. С его помощью удалось показать, что микробиота Ма не влияет на ПЖ сама по себе (табл. 8,

сравнение 7). И благодаря этому удалось дополнить результат предыдущего теста (где показано, что самцы Ма живут значимо дольше самцов Мбд) и подтвердить, что самки Ма тоже живут значимо дольше самок Мбд в сопоставимых условиях (при исключении влияния самцов), хотя различие совсем небольшое по абсолютной величине (табл. 8, сравнение 10).

По всей видимости, такое небольшое влияние генетического фактора легко может быть замаскировано влиянием микробиоты. Мы показали, что негативный эффект микробиоты Мн на ПЖ мух, неприспособленных к этой микробиоте, настолько ощутим, что небольшие различия по ПЖ между самками Ма и Мбд, обусловленные генетически, полностью нивелируются в присутствии этой микробиоты (табл. 8, сравнение 14).

Таким образом, на основе двух последних тестирований можно заключить, что результаты отбора на долголетие имеют генетическую компоненту, но сила эффекта оказалась невелика. Возможно, это объясняется тем, что в исходной популяции диких дрозофил не было значительного полиморфизма по аллелям, влияющим на ПЖ. Можно предположить, что гены, мутации в которых могут влиять на ПЖ, в природных популяциях находятся под сильным стабилизирующим отбором, то есть отбор эффективно элиминирует мутации в них, потому что такие мутации негативно влияют на приспособленность диких мух. Поэтому у таких генов низкий уровень полиморфизма. В природе мухи, скорее всего, не живут так долго, как в лаборатории, а умирают гораздо раньше от внешних причин. Тем не менее гены, влияющие на ПЖ, могут влиять также и на общую жизнеспособность, что в лабораторных условиях может проявиться, в частности, в замедленном старении и повышенной ПЖ.

Небольшое отличие по ПЖ между мухами Ма и Мбд и значительное увеличение ПЖ мух Мбд по сравнению с предковой линией Мн может быть отчасти объяснено особенностями диеты мух Мбд. Жизнь на нистатиновом корме Бд приводит к обеднению дрожжевой микробиоты мух (Яковлева и др., 2024), к тому же эта микробиота не развивается на корме Бд и диета мух становится

ограниченной (поскольку белковый компонент диеты дрозофил обеспечивается в основном дрожжами), что продлевает жизнь мухам (Chippindale et al., 1993; Zheng et al., 2005; Tatar et al., 2014; Karahi et al., 2017; Flatt, 2020). Несмотря на отсутствие искусственного отбора на увеличение ПЖ в линии Мбд, жизнь в условиях обедненной микробиоты повышает шансы прожить долгую жизнь, что, согласно гипотезе Уильямса, может вести к усилению естественного отбора на долголетие (Williams, 1957).

Открытым остается вопрос, по какой причине и в какой момент линия Мн приобрела микробиоту, сокращающую жизнь, или в какой момент линии, произошедшие от линии Мн, ее утратили. Например, линия Мбд могла утратить часть своей микробиоты в результате содержания на корме с фунгистатическим препаратом (Яковлева и др., 2024), а линия Ма – в связи с отбором на долголетие, в ходе которого потомки могли «наследовать» микробиоту только от старых родителей. Известно, что микробиота дрозофил сильно меняется с возрастом (Ren et al., 2007; Claesson et al., 2011; Erkosar et al., 2013; Smith et al., 2017; Lee et al., 2019; Дмитриева и др., 2021). Можно предположить, что доживают до позднего возраста в основном те мухи, чья микробиота благоприятствует долгой жизни. В этом случае отбор мух на долголетие неизбежно ведет и к отбору соответствующей микробиоты. Необходимость проверки данного предположения может стать достойным поводом для продолжения настоящего исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный долгосрочный эволюционный эксперимент позволил охарактеризовать фенотипическую пластичность и эволюционные изменения параметров жизненного цикла *D. melanogaster* — представителя двукрылых насекомых — под действием трофических, пространственных и симбиотических факторов среды. Показано, что продолжительность жизни, возрастная динамика смертности и плодовитости и эффективность размножения взаимосвязанные характеристики, обладающие высокой эволюционной пластичностью.

Адаптация мух к разным стрессовым кормам в гомогенных и пространственно гетерогенных условиях модулирует избирательную или неизбирательную смертность, миграционную активность, то есть разный характер отбора, которому подвергаются организмы в природе при изменении условий окружающей среды. Благодаря этому удалось проверить справедливость ряда классических идей об эволюции параметров жизненного цикла, в частности гипотезу Уильямса об антагонистической плеiotропии аллелей, повышающих приспособленность организмов в молодости ценой снижения приспособленности в позднем возрасте.

Значительное влияние на модификационную изменчивость и эволюционные изменения продолжительности жизни оказывает симбиотическая микробиота, которая выступает не как пассивный компонент, а как активный участник эволюционных изменений. Микробиота подвергается отбору в ходе адаптации организма хозяина к меняющимся условиям среды и оказывает влияние на его параметры жизненного цикла. Пониженная приспособленность мух, лишенных дрожжей, может объяснять, почему в ходе эволюции дрожжи стали обязательным компонентом ассоциированной с мухами микробиоты. Эти результаты согласуются с хологеномной теорией эволюции, рассматривающей организм и ассоциированную с ним микробиоту в качестве единицы отбора.

Полученные результаты расширяют представления о том, какими путями и за счет каких механизмов может происходить быстрая адаптация организмов к

меняющимся условиям среды. Параметры жизненного цикла *D. melanogaster* формируются в системе взаимодействий насекомого с абиотическими и биотическими компонентами среды. Трофические условия, пространственная неоднородность среды и симбиотические связи способны изменять возрастную динамику размножения, продолжительность жизни и темпы репродуктивного старения. Исследования на *D. melanogaster* позволяют выявлять общие механизмы подобных изменений и формулировать гипотезы для сравнительного изучения старения, жизненных циклов и адаптаций у других групп насекомых.

Перспективы дальнейших исследований связаны с анализом генетических и микробиологических механизмов, обеспечивающих согласованную эволюцию насекомого и его ассоциированной микробиоты, и оценкой их влияния на такие важные показатели приспособленности, как продолжительность жизни, эффективность размножения, динамика смертности и плодовитости.

ВЫВОДЫ

1. Эксперимент на крахмальном корме, приводящем к гибели имаго дрозофил на 5–7 сутки, позволил смоделировать отбор в условиях высокой неизбирательной смертности (аналог эфемерных субстратов в природе). Адаптация к этому корму привела к наследуемому сокращению продолжительности жизни имаго дрозофил, росту плодовитости в молодом возрасте и ускорению репродуктивного старения. Это подтверждает гипотезу Уильямса об эволюции ускоренного старения под влиянием высокой неизбирательной смертности.

2. В ходе адаптации к неблагоприятному корму с повышенным содержанием соли продолжительность жизни мух не понизилась, а репродукция не сместилась на более молодой возраст. Это, по-видимому, обусловлено тем, что смертность на соленом корме, в отличие от крахмального корма, избирательна, то есть зависит от состояния организма.

3. Содержание мух в условиях выбора между двумя неблагоприятными кормами привело к формированию фенотипа генералистов: мухи продемонстрировали увеличенную продолжительность жизни и замедленное репродуктивное старение не только по сравнению с мухами, адаптированными к одному из типов неблагоприятного корма (без возможности выбора), но и по сравнению с контрольными мухами на стандартном корме. Таким образом, подтверждена гипотеза о том, что пространственная гетерогенность среды может способствовать генерализации (выработке разносторонних адаптаций) без потери конкурентоспособности в каждой конкретной среде.

4. Снижение обилия живых дрожжей в симбиотической микробиоте мух ведет к росту средней продолжительности жизни и снижению плодовитости (при культивировании мух на стандартном корме). Однако рост продолжительности жизни не компенсирует снижение плодовитости, то есть приспособленность мух с обедненной дрожжевой микробиотой понижена по сравнению с контрольной линией, сохраняющей свою естественную микробиоту.

5. Различия по продолжительности жизни между линиями мух, возникающие в ходе эволюционных экспериментов, обусловлены не только изменениями в генофонде популяции, но и изменениями в микробиоте, которая в ходе отбора организма-хозяина также подвержена адаптивным изменениям. С передачей микробиоты от одной популяции мух к другой такой признак, как продолжительность жизни, тоже может передаваться.

6. Игнорирование или отсутствие контроля микробиоты может приводить к ошибочным выводам в исследованиях, связанных с тестированием дрозофил на продолжительность жизни и другие параметры жизненного цикла. Влияние микробиоты как на фенотипическую пластичность, так и на эволюционные изменения ряда признаков может маскировать эффекты других факторов.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Автор работы являлся ключевым (а часто и единственным) исполнителем всех этапов исследования:

- Постановка и дизайн тестирований выполнена автором совместно с Марковым А.В. и Наймарк Е.Б.;
- Линии дрозофил Мбд и Ма выводились и поддерживались автором самостоятельно; линии, содержащиеся на соленом и крахмальном кормах, а также линии из двойного бокса, которые использовались в Тестах 1-7, поддерживались Марковым А.В. и Наймарк Е.Б. и ими предоставлены для тестирований; остальные линии дрозофил поддерживались на кафедре биологической эволюции её сотрудниками к.б.н. Перфильевой К.С., к.б.н. Широковой Н.Г. и Корниловой М.Б. и ими предоставлены для тестирований;
- Тесты 1–3, 9–10 и 12 проводились лично автором;
- Тесты 4–7 проводились автором при участии студентов биологического факультета МГУ Горшковой А.А. и Фетисовой Е.С.;
- Тесты 8 и 12 проводились автором при консультировании микробиолога, к.б.н. Максимовой И.А.;
- Тест 13 проводились автором при участии студентов биологического факультета МГУ Мерзликина Д.С. и Мироновой Е.А.;
- Тест 14 проводились автором при участии студентов биологического факультета МГУ Мерзликина Д.С., Завьялова А.Е. и Маслова А.А.;
- Статистическая обработка всех результатов и их графическое представление проводились автором;
- Интерпретация полученных результатов и их публикация в научных журналах проводилась автором совместно с научными консультантами Марковым А.В., Наймарк Е.Б., Максимовой И.А.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор работы выражает глубокую благодарность:

- заведующему кафедрой биологической эволюции биологического факультета МГУ с 2014 по 2023 гг., д.б.н. Маркову А.В. за научное руководство, помощь в планировании и проведении тестирований, моральную поддержку;
- д.б.н., заведующему лабораторией эволюционной генетики развития Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН Куликову Алексею Михайловичу за научное руководство работой на ее завершающем этапе и моральную поддержку;
- ведущему научному сотруднику палеонтологического института им. А.А. Борисяка РАН, д.б.н. Наймарк Е.Б. за участие в проведении тестирований, научное консультирование и моральную поддержку;
- сотрудникам кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ к.б.н. Максимовой И.А., к.б.н. Качалкину А.В., к.б.н. Белову А.А. за научное консультирование и помощь при проведении микробиологической части исследования (идентификация видов дрожжей);
- сотрудникам кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ к.б.н. Ивницкому С.Б. и к.б.н. Лысенкову С.Н. за научное консультирование при проведении исследования;
- сотрудникам кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ к.б.н. Перфильевой К.С., к.б.н. Широковой Н.Г. и Корниловой М.Б. за поддержание лабораторных линий дрозофил и помощь в проведении исследования;
- студентам биологического факультета МГУ Горшковой А.А., Фетисовой Е.С., Мерзликину Д.С., Завьялову А.Е., Маслову А.А., Мироновой Е.А. за участие в проведении тестирований на лабораторных линиях *D. melanogaster*;
- а также всем сотрудникам, аспирантам и студентам кафедры биологической эволюции и кафедры энтомологии биологического факультета МГУ за ценные советы по улучшению отдельных частей исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бычкова И.Б., Мыльников С.В., Опарина Т. О дискретности кривых дожития у *Drosophila melanogaster* линии Canton-S. Сообщение 4. Воздействие пониженной температурой на раннем этапе имагинального развития // Успехи геронтологии. — 2017. — Т. 30, № 3. — С. 323–331.
2. Вайсерман А.М., Загуба Г.О., Писарчук А.В., Кошель Н.М., Козерецкая И.А., Караман А.С. Влияние повышенной плотности популяции на личиночной стадии развития на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // Проблемы старения и долголетия. — 2017. — Т. 26, № 1–2. — С. 34–42.
3. Горшкова А.А., Фетисова Е.С., Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние пространственной гетерогенности среды на адаптацию *Drosophila melanogaster* к неблагоприятным кормовым субстратам: результаты эволюционного эксперимента // Журнал общей биологии. — 2018. — Т. 79, № 1. — С. 3–17.
4. Дмитриева А.С., Ивницкий С.Б., Марков А.В. Адаптация *Drosophila melanogaster* к неблагоприятному кормовому субстрату сопровождается расширением трофической ниши // Журнал общей биологии. — 2016. — Т. 77, № 4. — С. 249–261.
5. Дмитриева А.С., Максимова И.А., Качалкин А.В., Марков А.В. Возрастные изменения дрожжевой составляющей микробиома *Drosophila melanogaster* // Микробиология. — 2021. — Т. 90, № 2. — С. 226–235. DOI: 10.31857/S0026365621020051
6. Дмитриева А.С., Яковлева Е.Ю., Максимова И.А., Белов А.А., Марков А.В. Изменения комплекса симбиотических дрожжей *Drosophila melanogaster* при адаптации мух к субстратам с повышенным содержанием NaCl // Журнал общей биологии. — 2022. — Т. 83, № 1. — С. 29–37.
7. Ивницкий С.Б., Максимова И.А., Панченко П.Л., Дмитриева А.С., Качалкин А.В., Корнилова М.Б., Перфильева К.С., Марков А.В. Роль микробиома в

- адаптации *Drosophila melanogaster* к кормовому субстрату с повышенной концентрацией NaCl // Журнал общей биологии. — 2018. — Т. 79, № 5. — С. 393–403.
8. Иорданский Н.Н. Фенотипическая пластичность организмов и эволюция // Журнал общей биологии. — 2009. — Т. 70, № 1. — С. 3–9.
 9. Калебина Т.С., Рекстина В.В., Горковский А.А., Королев А.Г., Ерещенко М.И., Моторин Н.А., Моренков О.С., Иноземцев А.Н. Сочетанное воздействие белка с амилоидными свойствами Bgl2p и других компонентов клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на состояние кожных покровов и поведение мышей // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2021. — № 3. — С. 86–97. DOI: 10.14427/jirai.2021.3.86
 10. Креславский А.Г. Симпатрическое видообразование у животных: дизруптивный отбор или экологическая сегрегация? // Журнал общей биологии. — 1994. — Т. 55, № 4–5. — С. 404–419.
 11. Марков А.В. Может ли родственный отбор способствовать развитию генетической программы старения // Биохимия. — 2012. — Т. 77, № 7. — С. 882–892.
 12. Марков А.В., Ивницкий С.Б. Эволюционная роль фенотипической пластичности // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. — 2016. — № 4. — С. 3–11.
 13. Марков А.В., Ивницкий С.Б., Корнилова М.Б., Наймарк Е.Б., Широкова Н.Г., Перфильева К.С. Материнский эффект маскирует адаптацию к неблагоприятным условиям и затрудняет дивергенцию у *Drosophila melanogaster* // Журнал общей биологии. — 2015. — Т. 76, № 6. — С. 429–437.
 14. Марков А.В., Наймарк Е.Б., Яковлева Е.Ю. Временное масштабирование возрастной динамики смертности: ход старения *Caenorhabditis elegans* легко замедлить или ускорить, но трудно изменить его траекторию (о статье Страуструпа и соавт., опубликованной в журнале «Nature» в т. 530, стр. 103–107, 2016) // Биохимия. — 2016. — Т. 81, № 8. — С. 1145–1152.

15. Михайлова М.В., Лохов П.Г., Ипатова О.М., Згода В.Г., Арчаков А.И. Щука: жизнь без старения? // *Научный диалог: Вопросы медицины*. Сборник научных трудов, по материалам международной научно-практической конференции 15 сентября 2017 г. М.: ЦНК МНИФ «Общественная наука», 2017. — С. 29–38.
16. Москалев А.А., Шосталь О.А., Зайнуллин В.Г. Генетические аспекты влияния различных режимов освещения на продолжительность жизни дрозофилы // *Успехи геронтологии*. — 2006. — Т. 18. — С. 55–58.
17. Панченко П.Л., Корнилова М.Б., Перфильева К.С., Марков А.В. Симбиотическая микробиота вносит вклад в адаптацию *Drosophila melanogaster* к неблагоприятной кормовой среде // *Известия РАН. Серия биологическая*. — 2017. — № 4. — С. 341–351.
18. Рекстина В.В., Горковский А.А., Безсонов Е.Е., Калебина Т.С. Амилоидные белки поверхности микроорганизмов: структура, свойства и значение для медицины // *Вестник РГМУ*. — 2016. — № 1. — С. 4–13.
19. Скулачев В.П. Феноптоз: запрограммированная смерть организма // *Биохимия*. — 1999. — Т. 64, № 12. — С. 1679–1688.
20. Яковлева Е.Ю., Максимова И.А., Мерзликин Д.С., Качалкин А.В., Марков А.В. Влияние разных видов дрожжей на продолжительность жизни и плодовитость *Drosophila melanogaster* // *Журнал общей биологии*. — 2024. — Т. 85, № 3. — С. 165–186. DOI: 10.31857/S0044459624030013
21. Яковлева Е.Ю., Мерзликин Д.С., Завьялов А.Е., Маслов А.А., Миронова Е.А., Марков А.В. Вклад генов и симбиотической микробиоты в увеличение продолжительности жизни мух *Drosophila melanogaster*, отбираемых на позднее размножение // *Журнал общей биологии*. — 2022. — Т. 83, № 4. — С. 268–287. DOI: 10.31857/S004445962204008X
22. Яковлева Е.Ю., Наймарк Е.Б., Марков А.В. Влияние адаптации *Drosophila melanogaster* к неблагоприятному кормовому субстрату на продолжительность жизни и возрастную динамику плодовитости //

- Биохимия. — 2016. — Т. 81, № 12. — С. 1721–1739.
23. Abrams P.A. Does increased mortality favor the evolution of more rapid senescence? // *Evolution*. — 1993. — No. 47. — P. 877–887. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1993.tb01241.x
24. Ackermann M., Doebele M. Evolution of niche width and adaptive diversification // *Evolution*. — 2004. — Vol. 58, No. 12. — P. 2599–2612. DOI: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb01614.x
25. Anagnostou C., Dorsch M., Rohlf M. Influence of dietary yeasts on *Drosophila melanogaster* life-history traits // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. — 2010. — Vol. 136, No. 1. — P. 1–11. DOI: 10.1111/j.1570-7458.2010.00997.x
26. Anbutu H., Moriyama M., Nikoh N., Hosokawa T., Futahashi R., Tanahashi M., Meng X.-Y., Kuriwada T., Mori N., Oshima K., Hattori M., Fujie M., Satoh N., Maeda T., Shigenobu S., Koga R., Fukatsu T. Small genome symbiont underlies cuticle hardness in beetles // *PNAS*. — 2017. — Vol. 114. — P. 8381–8391. DOI: 10.1073/pnas.1712857114
27. Arbuthnott D., Rundle H.D. Misalignment of natural and sexual selection among divergently adapted *Drosophila melanogaster* populations // *Animal Behaviour*. — 2014. — Vol. 87. — P. 45–51. DOI: /10.1016/j.anbehav.2013.10.005
28. Archer M.A., Phelan J.P., Beckman K.A., Rose M.R. Breakdown in correlations during laboratory evolution. II. Selection on stress resistance in *Drosophila* populations // *Evolution*. — 2003. — Vol. 57. — P. 536–543. DOI: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb01545.x
29. Arias-Rojas A., Iatsenko I. The role of microbiota in *Drosophila melanogaster* aging // *Frontiers in Aging*. — 2022. — Vol. 3. — Art. 909509. DOI: 10.3389/fragi.2022.909509
30. Arora J., Brisbin M.A.M., Mikheyev A.S. Effects of microbial evolution dominate those of experimental host-mediated indirect selection // *PeerJ*. — 2020. — Vol. 8. — Art. e9350. DOI: 10.7717/peerj.9350

31. Arroyo-López F.N., Durán-Quintana M.C., Ruiz-Barba J.L., Querol A., Garrido-Fernández A. Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives // *Food Microbiology*. — 2006. — Vol. 23, No. 8. — P. 791–796. DOI: 10.1016/j.fm.2006.02.008
32. Baret P.V., Le Bourg E., Lints F.A. Selection for increased longevity in *Drosophila melanogaster*: reflections on new data // *Gerontology*. — 1996. — Vol. 42, No 1. — P. 14-17. DOI: 10.1159/000213765
33. Barker J.S.F., East P.D., Phaff H.J., Miranda M. The ecology of the yeast flora in necrotic *Opuntia cacti* and of associated *Drosophila* in Australia // *Microbial Ecology*. — 1984. — Vol. 10. — P. 379–399. DOI: 10.1007/BF02015562
34. Barrett R.D.H., MacLean R.C., Bell G. Experimental Evolution of *Pseudomonas fluorescens* in Simple and Complex Environments // *The American Naturalist*. — 2005. — Vol. 166, No. 4. — P. 470–479. DOI: 10.1086/444440
35. Begon M. Yeast and *Drosophila* // *The Genetics and Biology of Drosophila* / Ed. by M. Ashburner, H.L. Carson, J.N. Thompson Jr. London: Academic Press, 1982. — P. 345–384.
36. Belkina E.G., Naimark E.B., Gorshkova A.A., Markov A.V. Does adaptation to different diets result in assortative mating? Ambiguous results from experiments on *Drosophila* // *Journal of Evolutionary Biology*. — 2018. — Vol. 31, No. 12. — P. 1803–1814. DOI: 10.1111/jeb.13375
37. Bell G., Reboud X. Experimental evolution in *Chlamydomonas*. II. Genetic variation in strongly contrasted environments // *Heredity*. — 1997. — Vol. 78, No. 5. — P. 498–511. DOI: 10.1038/hdy.1997.78
38. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing // *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*. — 1995. — Vol. 57. — P. 289–300. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

39. Bennett A.F., Hughes B.S. Microbial experimental evolution // *American Journal of Physiology*. — 2009. — Vol. 297, No. 1. — P. R17–R25. DOI: 10.1152/ajpregu.90562.2008
40. Billeter J.-C., Wolfner M.F. Chemical Cues that Guide Female Reproduction in *Drosophila melanogaster* // *Journal of Chemical Ecology*. — 2018. — Vol. 44, No. 9. — P. 750–769. DOI: 10.1007/s10886-018-0947-z
41. Blum J.E., Fischer C.N., Miles J., Handelsman J. Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster* // *mBio*. — 2013. — Vol. 4. — Art. e00860. DOI: 10.1128/mBio.00860-13
42. Bordenstein S.R., Theis K.R. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes // *PLoS Biology*. — 2015. — Vol. 13, No. 8. — Art. e1002226. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002226
43. Broderick N.A., Lemaitre B. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster* // *Gut Microbes*. — 2012. — Vol. 3, No. 4. — P. 307–321. DOI: 10.4161/gmic.19896
44. Brummel T., Ching A., Seroude L., Simon A.F., Benzer S. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2004. — Vol. 101. — P. 12974–12979. DOI: 10.1073/pnas.0405207101
45. Bubliy O.A., Loeschcke V. Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanogaster* // *Journal of Evolutionary Biology*. — 2005. — Vol. 18, No. 4. — P. 789–793. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2005.00928.x
46. Burke M.K., Rose M.R. Experimental evolution with *Drosophila* // *American Journal of Physiology*. — 2009. — Vol. 296. — P. R1847–R1854. DOI: 10.1152/ajpregu.90551.2008
47. Carazo P., Tan C.K.W., Allen F., Wigby S., Pizzari T. Within-group male relatedness reduces harm to females in *Drosophila* // *Nature*. — 2014. — Vol. 505. — P. 672–675. DOI: 10.1038/nature12949

- 48.Chandler J.A., Innocent L.V., Martinez D.J., Huang I.L., Yang J.L., Eisen M. B., Ludington W. B. Microbiome-by-ethanol interactions impact *Drosophila melanogaster* fitness, physiology, and behavior // iScience. — 2022. — Vol. 25, No. 4. — Art. 104000. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104000
- 49.Chapman T., Liddle L.F., Kalb J.M., Wolfner M.F., Partridge L. Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products // Nature. — 1995. — Vol. 373. — P. 241–244. DOI: 10.1038/373241a0
- 50.Charlesworth B., Williamson J.A. Probability of survival of a mutant gene in an age-structured population and implications for evolution of life-histories // Genetics Research. — 1975. — Vol. 26. — P. 1–10. DOI: 10.1017/s0016672300015792
- 51.Charnov E.L., Ernest S.K.M. The Offspring-Size/Clutch-Size Trade-Off in Mammals // The American Naturalist. — 2006. — Vol. 167, No. 4. — P. 578–582. DOI: 10.1086/501141
- 52.Charroux B., Royet J. Gut-microbiota interactions in non-mammals: what can we learn from *Drosophila*? // Seminars in Immunology. — 2012. — Vol. 24, No. 1. — P. 17–24. DOI: 10.1016/j.smim.2011.11.003
- 53.Chen H., Maklakov A.A. Longer Life Span Evolves under High Rates of Condition-Dependent Mortality // Current Biology. — 2012. — Vol. 22. — P. 2140–2143. DOI: 10.1016/j.cub.2012.09.021
- 54.Chen H., Maklakov A.A. Condition dependence of male mortality drives the evolution of sex differences in longevity // Current Biology. — 2014. — Vol. 24. — P. 2423–2427. DOI: 10.1016/j.cub.2014.08.055
- 55.Chippindale A.K., Leroi A.M., Kim S.B., Rose M.R. Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. I. Nutrition and the cost of reproduction // Journal of Evolutionary Biology. — 1993. — Vol. 6. — P. 171–193. DOI: 10.1046/j.1420-9101.1993.6020171.x
- 56.Claesson M.J., Cusack S., O’Sullivan O., Greene-Diniz R., de Weerd H., Flannery E., Marchesi J.R., Falush D., Dinan T., Fitzgerald G., Stanton C., van Sinderen D.,

- O'Connor M., Harnedy N., O'Connor K., Henry C., O'Mahony D., Fitzgerald A.P., Shanahan F., Twomey C., Hill C., Ross R.P., O'Toole P.W. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly // PNAS. — 2011. — Vol. 108. — P. 4586–4591. DOI: 10.1073/pnas.1000097107
57. Clark R.I., Salazar A., Yamada R., Fitz-Gibbon S., Morselli M., Alcaraz J., Rana A., Rera M., Pellegrini M., Ja W.W., Walker D.W. Distinct shifts in microbiota composition during *Drosophila* aging impair intestinal function and drive mortality // Cell Reports. — 2015. — Vol. 12, No. 10. — P. 1656–1667. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.08.004
58. Clark T.G., Bradburn M.J., Love S.B., Altman D.G. Survival analysis part I: Basic concepts and first analyses // British Journal of Cancer. — 2003. — Vol. 89, No. 2. — P. 232–238. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601118
59. Clarke J.M., Smith M. J. The genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. XI. Hybrid vigour and longevity // Journal of Genetics. — 1955. — Vol. 53. — P. 172–180. DOI: 10.1007/BF02981521
60. Condon C., Cooper B.S., Yeaman S., Angilletta M.J.Jr. Temporal variation favors the evolution of generalists in experimental populations of *Drosophila melanogaster* // Evolution. — 2014. — Vol. 68, No. 3. — P. 720–728. DOI: 10.1111/evo.12296
61. Cooper D.M. Food preferences of larval and adult *Drosophila* // Evolution. — 1960. — Vol. 14. — P. 41–55. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1960.tb03055.x
62. Cooper V.S., Lenski R.E. The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations // Nature. — 2000. — Vol. 407. — P. 736–739. DOI: 10.1038/35037572
63. Crispo E. The Baldwin effect and genetic assimilation: revisiting two mechanisms of evolutionary change mediated by phenotypic plasticity // Evolution. — 2007. — Vol. 61. — P. 2469–2479. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2007.00203.x

64. Currie C.C., Poulsen M., Mendenhall J., Boomsma J., Billen J. Coevolved Crypts and Exocrine Glands Support Mutualistic Bacteria in Fungus-Growing Ants // *Science*. — 2006. — Vol. 311. — P. 81–83. DOI: 10.1126/science.1119744
65. Depetris-Chauvin A., Galagovsky D., Grosjean Y. Chemicals and chemoreceptors: Ecologically relevant signals driving behavior in *Drosophila* // *Frontiers in Ecology and Evolution*. — 2015. — Vol. 3. — Art. 41. DOI: 10.3389/fevo.2015.00041
66. Dmitrieva A.S., Ivnitsky S.B., Maksimova I.A., Panchenko P.L., Kachalkin A.V., Markov A.V. Symbiotic yeasts affect adaptation of *Drosophila melanogaster* to food substrate with high NaCl concentration // *PLOS ONE*. — 2019. — Vol. 14, No. 11. — Art. e0224811. DOI: 10.1371/journal.pone.0224811
67. Dodd D.M.B. Reproductive isolation as a consequence of adaptive divergence in *Drosophila pseudoobscura* // *Evolution*. — 1989. — Vol. 43. — P. 1308–1311. DOI: 10.2307/2409365
68. Doore S.M., Fane B.A. The microviridae: Diversity, assembly, and experimental evolution // *Virology*. — 2016. — Vol. 491. — P. 45–55. DOI: 10.1016/j.virol.2016.01.020
69. Douglas A.E. The *Drosophila* model for microbiome research // *Lab Animal*. — 2018. — Vol. 47, No. 6. — P. 157–164. DOI: 10.1038/s41684-018-0065-0
70. Duncan A.B., Fellous S., Quillery E., Kaltz O. Adaptation of *Paramecium caudatum* to variable conditions of temperature stress // *Research in Microbiology*. — 2011. — No. 162. — P. 939–944. DOI: 10.1016/j.resmic.2011.04.012
71. Duxbury E.M.L., Chapman T. Sex-specific responses of life span and fitness to variation in developmental versus adult diets in *Drosophila melanogaster* // *The Journals of Gerontology: Series A*. — 2020. — Vol. 75, No. 8. — P. 1431–1438. DOI: 10.1093/gerona/glz175
72. Dweck H.K.M., Ebrahim S.A.M., Kromann S., Bown D., Hillbur Y., Sachse S., Hansson B. S., Stensmyr M. C. Olfactory Preference for Egg Laying on Citrus

- Substrates in *Drosophila* // Current Biology. — 2013. — Vol. 23, No. 24. — P. 2472–2480. DOI: 10.1016/j.cub.2013.10.047
- 73.Ebert D. The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna*: The influence of genetic, environmental, and maternal effects // Archives of Hydrobiology. — 1993. — Vol. 90. — P. 453–473.
- 74.Elena S.F., Agudelo-Romero P., Carrasco P., Codoñer F.M., Martín S., Torres-Barceló C., Sanjuán R. Experimental evolution of plant RNA viruses // Heredity. — 2008. — Vol. 100. — P. 478–483. DOI: 10.1038/sj.hdy.6801088
- 75.Epstein S.S. The phenomenon of microbial uncultivability // Current Opinion in Microbiology. — 2013. — Vol. 16, No. 5. — P. 636–642. DOI: 10.1016/j.mib.2013.08.003
- 76.Erkosar B., Storelli G., Defaye A., Leulier F. Host-intestinal microbiota mutualism: “Learning on the fly” // Cell Host & Microbe. — 2013. — Vol. 13. — P. 8–14. DOI: 10.1016/j.chom.2012.12.004
- 77.Fast D., Kostiuk B., Foley E., Pukatzki S. Commensal pathogen competition impacts host viability // PNAS. — 2018. — Vol. 115. — P. 7099–7104. DOI: 10.1073/pnas.1802165115
- 78.Fellowes M.D.E., Kraaijeveld A.R., Godfray H.C.J. Trade-off associated with selection for increased ability to resist parasitoid attack in *Drosophila melanogaster* // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. — 1998. — Vol. 265, No. 1409. — P. 1553–1558. DOI: 10.1098/rspb.1998.0460
- 79.Filice D.C.S., Long T.A.F. Genetic variation in male-induced harm in *Drosophila melanogaster* // Biology Letters. — 2016. — Vol. 12, No. 4. — Art. 20160105. DOI: 10.1098/rsbl.2016.0105
- 80.Fitzpatrick B.M. Underappreciated consequences of phenotypic plasticity for ecological speciation // International Journal of Ecology. — 2012. — Vol. 2012. — Art. 256017. DOI: 10.1155/2012/256017

- 81.Flatt T. Life-history evolution and the genetics of fitness components in *Drosophila melanogaster* // Genetics. — 2020. — Vol. 214, No. 1. — P. 3–48. DOI: 10.1534/genetics.119.300160
- 82.Foley J., McPherson J., Roger M., Batista C., Mauxion R., Hernández G., Kelson R., Young F.J., McMillan W.O., Montgomery S.H. Evolution of increased longevity and slowed ageing in a genus of tropical butterfly // Nature Communications. — 2026. — Vol. 17. — Art. 5077. DOI: 10.1038/s41467-026-73635-7
- 83.Fowler K., Partridge L. A cost of mating in female fruitflies // Nature. — 1989. — Vol. 338, No. 6218. — P. 760–761. DOI: 10.1038/338760a0
- 84.Francis A. *Business Mathematics and Statistics*. 6th ed. UK: Cengage Learning EMEA, 2008. — 666 p.
- 85.Friberg U. Genetic Variation in Male and Female Reproductive Characters Associated with Sexual Conflict in *Drosophila melanogaster* // Behavior Genetics. — 2005. — Vol. 35, No. 4. — P. 455–462. DOI: 10.1007/s10519-004-1246-8
- 86.Futuyma D.J. *Evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2005. 603 p.
- 87.Futuyma D.J. Evolutionary biology today and the call for an extended synthesis // Interface Focus. — 2017. — Vol. 7, № 5. — Art. 20160145. DOI: 10.1098/rsfs.2016.0145
- 88.Futuyma D.J., Moreno G. The evolution of ecological specialization // Annual Review of Ecology and Systematics. — 1988. — No. 19. — P. 207–233. DOI: 10.1146/annurev.es.19.110188.001231
- 89.Galor O., Klemp M. Human genealogy reveals a selective advantage to moderate fecundity // Nature Ecology and Evolution. — 2019. — Vol. 3. — P. 853–857. DOI: 10.1038/s41559-019-0846-x
- 90.Gavrilov L.A., Gavrilova N. S. Evolutionary theories of aging // The Scientific World Journal. — 2002. — Vol. 2. — P. 339–356. DOI: 10.1100/tsw.2002.96
- 91.Ghalambor C.K., Hoke K.L., Ruell E.W., Fischer E.K., Reznick D.N., Hughes K. A. Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression

- in nature // Nature. — 2015. — Vol. 525. — P. 372–375.
DOI: 10.1038/nature15256
92. Giesel J. T., Murphy P. A., Manlove M. N. The influence of temperature on genetic interrelationships of life history traits in a population of *Drosophila melanogaster*: What tangled data sets we weave // American Naturalist. — 1982. — Vol. 119. — P. 464–479. DOI: 10.1086/283926
93. Gillespie J.H., Turelli M. Genotype-environment interactions and the maintenance of polygenic variation // Genetics. — 1989. — Vol. 121, No. 1. — P. 129–138. DOI: 10.1093/genetics/121.1.129
94. Goddard M.R. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation // Ecology. — 2008. — Vol. 89. — P. 2077–2082. DOI: 10.1890/07-2060.1
95. Good B.H., McDonald M.J., Barrick J.E., Lenski R.E., Desai M.M. The dynamics of molecular evolution over 60,000 generations // Nature. — 2017. — Vol. 551 — P. 45–50. DOI: 10.1038/nature24287
96. Gould A.L., Zhang V., Lamberti L., Jones E.W., Obadia B., Korasidis N., Gavryushkin A., Carlson J.M., Beerenwinkel N., Ludington W.B. Microbiome interactions shape host fitness // PNAS. — 2018. — Vol. 115, No. 51. — P. E11951–E11960. DOI: 10.1073/pnas.1809349115
97. Grandison R.C., Piper M.D.W., Partridge L. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila* // Nature. — 2009. — Vol. 462. — P. 1061–1064. DOI: 10.1038/nature08619
98. Gray J.C., Cutter A.D. Mainstreaming *Caenorhabditis elegans* in experimental evolution // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. — 2014. — Vol. 281, No. 1778. — 20133055. DOI: 10.1098/rspb.2013.3055
99. Grether G.F. Environmental change, phenotypic plasticity, and genetic compensation // The American Naturalist. — 2005. — Vol. 166. — P. 115–123. DOI: 10.1086/432023

100. Guilhot R., Rombaut A., Xuéreb A., Howell K., Fellous S. Influence of bacteria on the maintenance of a yeast during *Drosophila melanogaster* metamorphosis // Animal Microbiome. — 2021. — Vol. 68, No. 3. — P. 1–8. DOI: 10.1186/s42523-021-00133-0
101. Gullan P.J., Kosztarab M. Adaptations in scale insects // Annual Review of Entomology. — 1997. — Vol. 42. — P. 23–50. DOI: 10.1146/annurev.ento.42.1.23
102. Haldane J.B.S. *New Paths in Genetics*. London: Allen and Unwin, 1941. — 206 p.
103. Hamilton W.D. The moulding of senescence by natural selection // Journal of Theoretical Biology. — 1966. — Vol. 12. — P. 12–45. DOI: 10.1016/0022-5193(66)90184-6
104. Harcombe W.R., Chacón J.M., Adamowicz E.M., Chubiz L.M., Marx C.J. Evolution of bidirectional costly mutualism from byproduct consumption // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2018. — Vol. 115, No. 47. — P. 12000–12004. DOI: 10.1073/pnas.1810949115
105. Harris C.R., Millman K.J., van der Walt S.J., Gommers R., Virtanen P., Cournapeau D., Wieser E., Taylor J., Berg S., Smith N.J., Kern R., Picus M., Hoyer S., van Kerkwijk M.H., Brett M., Haldane A., Fernández del Río J., Wiebe M., Peterson P., Gérard-Marchant P., Sheppard K., Reddy T., Weckesser W., Abbasi H., Gohlke C., Oliphant T.E. Array programming with NumPy // Nature. — 2020. — Vol. 585, No. 7825. — P. 357–362. DOI: 10.1038/s41586-020-2649-2
106. Hedrick L.R., Burke G.C. Two new yeasts from Hawaiian fruit flies // Mycopathologia. — 1951. — Vol. 6. — P. 92–95. DOI: 10.1007/BF02279182
107. Hoang D., Kopp A., Chandler J.A. Interactions between *Drosophila* and its natural yeast symbionts — Is *Saccharomyces cerevisiae* a good model for studying the fly-yeast relationship? // PeerJ. — 2015. — Vol. 3. — Art. e1116. DOI: 10.7717/peerj.1116

108. Hodin J., Riddiford L.M. Parallel alterations in the timing of ovarian ecdysone receptor and ultraspiracle expression characterize the independent evolution of larval reproduction in two species of gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) // Development Genes and Evolution. — 2000. — Vol. 210, No. 7. — P. 358–372. DOI: 10.1007/s004270000079
109. Hoffmann A.A., Willi Y. Detecting genetic responses to environmental change // Nature Reviews Genetics. — 2005. — Vol. 6, No. 11. — P. 895–907. DOI: 10.1038/nrg2339
110. Hoskins R.A., Phan A.C., Naemuddin M., Mapa F.A., Ruddy D.A., Ryan J.J., Young L.M., Wells T., Kopczynski C., Ellis M.C. Single nucleotide polymorphism markers for genetic mapping in *Drosophila melanogaster* // Genome Res. — 2001. — Vol. 11, №6. — P.1100-1113. DOI: 10.1101/gr.gr-1780r
111. Huang Y., Stinchcombe J.R., Agrawal A.F. Quantitative genetic variance in experimental fly populations evolving with or without environmental heterogeneity // Evolution. — 2015. — Vol. 69, No. 10. — P. 2735–2746. DOI: 10.1111/evo.12771
112. Hughes B.S., Cullum A.J., Bennett A.F. An experimental evolutionary study on adaptation to temporally fluctuating pH in *Escherichia coli* // Physiological and Biochemical Zoology. — 2007. — No. 80. — P. 406–421. DOI: 10.1086/518353
113. Hunter J.D. Matplotlib: A 2D graphics environment // Computing in Science & Engineering. — 2007. — Vol. 9, No. 3. — P. 90–95. DOI: 10.1109/MCSE.2007.55
114. Hutfilz C. Endocrine regulation of lifespan in insect diapause // Frontiers in Physiology. — 2022. — Vol. 13. — P. 825057. DOI: 10.3389/fphys.2022.825057
115. Jemielity S., Chapuisat M., Parker J.D., Keller L. Long live the queen: studying aging in social insects // Age. — 2005. — Vol. 27, No. 3. — P. 241–248. DOI: 10.1007/s11357-005-2916-z
116. Jiménez-Padilla Y., Adewusi B., Lachance M.-A., Sinclair B.J. Live yeasts accelerate *Drosophila melanogaster* larval development // Journal of Experimental

- Biology. — 2024. — Vol. 227, No. 19. — Art. jeb247932.
DOI: 10.1242/jeb.247932
117. Jones O.R., Scheuerlein A., Salguero-Gómez R., Camarda C.G., Schaible R., Casper B.B., Dahlgren J.P., Ehrlén J., García M.B., Menges E.S., Quintana-Ascencio P.F., Caswell H., Baudisch A., Vaupel J.W. Diversity of ageing across the tree of life // *Nature*. — 2014. — Vol. 505, No. 7482. — P. 169–173. DOI: 10.1038/nature12789
 118. Joshi A., Thompson J.N. Adaptation and specialization in a two-resource environment in *Drosophila* species // *Evolution*. — 1997. — Vol. 51, No. 3. — P. 846–855. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1997.tb03666.x
 119. Kapahi P., Kaeberlein M., Hansen M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models // *Ageing Research Reviews*. — 2017. — Vol. 39. — P. 3–14. DOI: 10.1016/j.arr.2016.12.005
 120. Kassen R. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity // *Journal of Evolutionary Biology*. — 2002. — Vol. 15, No. 2. — P. 173–190. DOI: 10.1046/j.1420-9101.2002.00377.x
 121. Kassen R., Bell G. Experimental evolution in *Chlamydomonas*. IV. Selection in environments that vary through time at different scales // *Heredity*. — 1998. — Vol. 80, No. 6. — P. 732–741. DOI: 10.1046/j.1365-2540.1998.00329.x
 122. Kawecki T.J., Lenski R.E., Ebert D., Hollis B., Olivieri I., Whitlock M.C. Experimental evolution // *Trends in Ecology and Evolution*. — 2012. — Vol. 27, No. 10. — P. 547–550. DOI: 10.1016/j.tree.2012.06.001
 123. Keebaugh E.S., Yamada R., Ja W.W. The nutritional environment influences the impact of microbes on *Drosophila melanogaster* lifespan // *mBio*. — 2019. — Vol. 10, No. 4. — Art. e00885. DOI: 10.1128/mBio.00885-19
 124. Ketola T., Mikonranta L., Zhang J., Saarinen K., Ormälä A.M., Friman V.P., Mappes J., Laakso J. Fluctuating temperature leads to evolution of thermal generalism and preadaptation to novel environments // *Evolution*. — 2013. — Vol. 67, No. 10. — P. 2936–2944. DOI: 10.1111/evo.12148

125. Keuls M. The use of the “Studentized range” in connection with an analysis of variance // *Euphytica*. — 1952. — Vol. 1. — P. 112–122. DOI: 10.1007/BF01908269
126. Kirkwood T.B. Evolution of ageing // *Nature*. — 1977. — Vol. 270. — P. 301–304. DOI: 10.1038/270301a0
127. Kirkwood T.B.L., Rose M.R. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. — 1991. — Vol. 332. — P. 15–24. DOI: 10.1098/rstb.1991.0028
128. Klepsatel P., Procházka E., Gáliková M. Crowding of *Drosophila* larvae affects lifespan and other life-history traits via reduced availability of dietary yeast // *Experimental Gerontology*. — 2018. — Vol. 110. — P. 298–308. DOI: 10.1016/j.exger.2018.06.016
129. Kliot A., Ghanim M. Fitness costs associated with insecticide resistance // *Pest Management Science*. — 2012. — Vol. 68, No. 11. — P. 1431–1437. DOI: 10.1002/ps.3395
130. Kneitel J.M., Chase J.M. Trade-offs in community ecology: linking spatial scales and species coexistence // *Ecology Letters*. — 2004. — Vol. 7, No. 1. — P. 69–80. DOI: 10.1046/j.1461-0248.2003.00551.x
131. Kosakamoto H., Yamauchi T., Akuzawa-Tokita Y., Nishimura K., Soga T., Murakami T., Mori H., Yamamoto K., Miyazaki R., Koto A., Miura M., Obata F. Local necrotic cells trigger systemic immune activation via gut microbiome dysbiosis in *Drosophila* // *Cell Reports*. — 2020. — Vol. 32, No. 3. — Art. 107938. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107938
132. Koyle M.L., Veloz M., Judd A.M., Wong A.C.-N., Newell P.D., Douglas A.E., Chaston J.M. Rearing the Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Under Axenic and Gnotobiotic Conditions // *Journal of Visualized Experiments*. — 2016. — Vol. 113. — Art. e54219. DOI: 10.3791/54219

133. Kramer B.H., van Doorn G.S., Weissing F.J., Pen I. Lifespan divergence between social insect castes: challenges and opportunities for evolutionary theories of aging // *Current Opinion in Insect Science*. — 2016. — Vol. 16. — P. 76–80. DOI: 10.1016/j.cois.2016.05.012
134. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds.) *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. — 2080 p.
135. Kussell E. Evolution in Microbes // *Annual Review of Biophysics*. — 2013. — Vol. 42, No. 1. — P. 493–514. DOI: 10.1146/annurev-biophys-083012-130320
136. Lavrynenko O., Rodenfels J., Carvalho M., Dye N.A., Lafont R., Eaton S., Shevchenko A. The ecdysteroidome of *Drosophila*: influence of diet and development // *Development*. — 2015. — Vol. 142, No. 21. — P. 3758–3768. DOI: 10.1242/dev.124982.
137. Le Vinh Thuy J., VandenBrooks J. M., Angilletta M. J. Developmental plasticity evolved according to specialist-generalist trade-offs in experimental populations of *Drosophila melanogaster* // *Biology Letters*. — 2016. — Vol. 12, No. 7. — Art. 20160379. DOI: 10.1098/rsbl.2016.0379
138. Lebreton S., Borrero-Echeverry F., Gonzalez F., Solum M., Wallin E.A., Hedenström E., Hansson B.S., Gustavsson A.-L., Bengtsson M., Birgersson G., Walker W.B., Dweck H.K.M., Becher P.G., Witzgall P. A *Drosophila* female pheromone elicits species-specific long-range attraction via an olfactory channel with dual specificity for sex and food // *BMC Biology*. — 2017. — Vol. 15, No. 1. — Art. 88. DOI: 10.1186/s12915-017-0427-x
139. Lee H.Y., Lee S.H., Lee J.H., Lee W.J., Min K.J. The role of commensal microbes in the lifespan of *Drosophila melanogaster* // *Aging*. — 2019. — Vol. 11, No. 13. — P. 4611–4640. DOI: 10.18632/aging.102073
140. Lee H.Y., Lee S.H., Min K.J. The increased abundance of commensal microbes decreases *Drosophila melanogaster* lifespan through an age-related intestinal barrier dysfunction // *Insects*. — 2022. — Vol. 13, No. 2. — Art. 219. DOI: 10.3390/insects13020219

141. Lee K.P., Simpson S.J., Clissold F.J., Brooks R., Ballard J.W., Taylor P.W., Soran N., Raubenheimer D. Lifespan and reproduction in *Drosophila*: new insights from nutritional geometry // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2008. — Vol. 105, No. 7. — P. 2498–2503. DOI: 10.1073/pnas.0710787105
142. Leftwich P.T., Hutchings M.I., Chapman T. Diet, Gut Microbes and Host Mate Choice: Understanding the significance of microbiome effects on host mate choice requires a case by case evaluation // BioEssays. — 2018. — Vol. 40, No. 12. — Art. 1800053. DOI: 10.1002/bies.201800053
143. Legros M., Koella J.C. Experimental evolution of specialization by a microsporidian parasite // BMC Evolutionary Biology. — 2010. — Vol. 10. — P. 159–165. DOI: 10.1186/1471-2148-10-159
144. Lehtovaara A., Schielzeth H., Flis I., Friberg U. Heritability of life span is largely sex limited in *Drosophila* // The American Naturalist. — 2013. — Vol. 182. — P. 653–665. DOI: 10.1086/673296
145. Lenski R.E. Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations // The ISME Journal. — 2017. — Vol. 11. — P. 2181–2194. DOI: 10.1038/ismej.2017.69
146. Levene H. Genetic equilibrium when more than one ecological niche is available // The American Naturalist. — 1953. — Vol. 87, No. 836. — P. 331–333. DOI: 10.1086/281792
147. Lewis M.T., Hamby K.A. Differential impacts of yeasts on feeding behavior and development in larval *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) // Scientific Reports. — 2019. — Vol. 9. — Art. 13370. DOI: 10.1038/s41598-019-48863-1
148. Li Y., Xu S., Wang L., Shi H., Wang H., Fang Z., Hu Y., Jin J., Du Y., Deng M., Wang L., Zhu Z. Gut microbial genetic variation modulates host lifespan, sleep, and motor performance // The ISME Journal. — 2023. — No. 10. — P. 1733–1740. DOI: 10.1038/s41396-023-01478-x

149. Linnen C., Tatar M., Promislow D. Cultural artifacts: a comparison of senescence in natural, laboratory-adapted and artificially selected lines of *Drosophila melanogaster* // Evolutionary Ecology Research. — 2001. — Vol. 3. — P. 877–888.
150. Linscott J. Digest: Unlocking the creative potential of specialization // Evolution. — 2019. — Vol. 73, No. 6. — P. 1322–1323. DOI: 10.1111/evo.13749
151. Liu G.-L., Chi Z., Wang G.-Y., Wang Z.-P., Li Y., Chi Z.-M. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications // Critical Reviews in Biotechnology. — 2015. — Vol. 35, No. 2. — P. 222–234. DOI: 10.3109/07388551.2013.833582
152. Lohr J.N., Galimov E.R., Gems D. Does senescence promote fitness in *Caenorhabditis elegans* by causing death? // Ageing Research Reviews. — 2019. — Vol. 50. — P. 58–71. DOI: 10.1016/j.arr.2019.01.008
153. Long T.A.F., Rowe L., Agrawal A.F. The effects of selective history and environmental heterogeneity on inbreeding depression in experimental populations of *Drosophila melanogaster* // The American Naturalist. — 2013. — Vol. 181, No. 4. — P. 532–544. DOI: 10.1086/669675
154. Longo V.D., Mitteldorf J., Skulachev V.P. Programmed and altruistic ageing // Nature Reviews Genetics. — 2005. — Vol. 6, No. 11. — P. 866–872. DOI: 10.1038/nrg1706
155. Luckinbill L.S., Arking R., Clare M.J., Cirocco W.C., Buck S.A. Selection for delayed senescence in *Drosophila melanogaster* // Evolution. — 1984. — Vol. 38, No. 5. — P. 996–1003. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1984.tb00369.x
156. Luckinbill L.S., Clare M.J. Selection for life span in *Drosophila melanogaster* // Heredity. — 1985. — Vol. 55. — P. 9–19. DOI: 10.1038/hdy.1985.66
157. Lynch M., Gabriel W. Environmental tolerance // The American Naturalist. — 1987. — Vol. 129, No. 2. — P. 283–303. DOI: 10.1086/284635

158. Mair W., Piper M.D.W., Partridge L. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila* // PLoS Biology. — 2005. — Vol. 3, No. 7. — P. 1305–1311. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030223
159. Margulis L., Fester R. (Eds.) *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis*. Cambridge: MIT Press, 1991. — 454 p.
160. Markov A.V., Lazebny O.E., Goryacheva I.I., Antipin M.I., Kulikov A.M. Symbiotic bacteria affect mating choice in *Drosophila melanogaster* // Animal Behaviour. — 2009. — Vol. 77, No. 5. — P. 1011–1017. DOI: 10.1016/j.anbehav.2009.01.011
161. Markow T.A. The secret lives of *Drosophila* flies // eLife. — 2015. — Vol. 4. — Art. e06793. DOI: 10.7554/eLife.06793
162. Markow T.A., O’Grady P.M. *Drosophila: A Guide to Species Identification and Use*. London: Academic Press, 2006. — 259 p.
163. Matthews M.K., Malcolm J., Chaston J.M. Microbiota influences fitness and timing of reproduction in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // Microbiology Spectrum. — 2021. — Vol. 9, No. 2. — Art. e0003421. DOI: 10.1128/Spectrum.00034-21
164. Matthews M.K., Wilcox H., Hughes R., Veloz M., Hammer A., Banks B., Walters A., Schneider K.J., Sexton C.E., Chaston J.M. Genetic influences of the microbiota on the life span of *Drosophila melanogaster* // Applied and Environmental Microbiology. — 2020. — Vol. 86, No. 10. — Art. e00305-20. DOI: 10.1128/AEM.00305-20
165. Mattison J.A., Roth G.S., Beasley M.T., Tilmont E.M., Handy A.M., Herbert R.L., Longo D.L., Allison D.B., Young J.E., Bryant M., Barnard D., Ward W.F., Qi W., Ingram D.K., De Cabo R. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study // Nature. — 2012. — Vol. 489, No. 7415. — P. 318–321. DOI: 10.1038/nature11432

166. Maynard C., Weinkove D. The Gut Microbiota and Ageing // Sub-cellular biochemistry. — 2018 — Vol. 90. — P. 351–371. DOI: 10.1007/978-981-13-2835-0_12
167. McFall-Ngai M.J. Unseen forces: the influence of bacteria on animal development // Developmental Biology. — 2002. — Vol. 242, No. 1. — P. 1–14. DOI: 10.1006/dbio.2001.0522
168. McKinney W. Data structures for statistical computing in Python // *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*. — 2010. — P. 56–61. DOI: 10.25080/Majora-92bf1922-00a
169. Medawar P.B. *An Unsolved Problem of Biology*. London: H.K. Lewis, 1952. — 284 p.
170. de Mendiburu F. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. — Version 1.3-7. — 2023. — URL: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
171. Mille-Lindblom C., von Wachenfeldt E., Tranvik L.J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death // Journal of Microbiological Methods. — 2004. — Vol. 59, No. 2. — P. 253–262. DOI: 10.1016/j.mimet.2004.07.010
172. Miller R.S., Thomas J.L. The effects of larval crowding and body size on the longevity of adult *Drosophila melanogaster* // Ecology. — 1958. — Vol. 39, No. 1. — P. 118–125. DOI: 10.2307/1929973
173. Min K.J., Tatar M. *Drosophila* diet restriction in practice: Do flies consume fewer nutrients? // Mechanisms of Ageing and Development. — 2006. — Vol. 127, No. 1. — P. 93–96. DOI: 10.1016/j.mad.2005.09.004
174. Miquel J., Lundgren P.R., Bensch K.G., Atlan H. Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster* // Mechanisms of Ageing and Development. — 1976. — Vol. 5, No. 5. — P. 347–370. DOI: 10.1016/0047-6374(76)90034-8
175. Morais P.B., Martins M.B., Klaczko L.B., Mendonca-Hagler L.C., Hagler A.N. Microbiology yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as

- resource partitioning among *Drosophila* spp. // Applied and Environmental Microbiology. — 1995. — Vol. 61, No. 12. — P. 4251–4257. DOI: 10.1128/aem.61.12.4251-4257.1995
176. Mousseau T.A., Uller T., Wapstra E., Badyaev A.V. Evolution of maternal effects: past and present // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. — 2009. — Vol. 364, No. 1520. — P. 1035–1038. DOI: 10.1098/rstb.2008.0303
177. Mueller L.D. Evolution of accelerated senescence in laboratory populations of *Drosophila* // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1987. — Vol. 84, No. 7. — P. 1974–1977. DOI: 10.1073/pnas.84.7.1974
178. Mure A., Sugiura Y., Maeda R., Honda K., Sakurai N., Takahashi Y., Watada M., Katoh T., Gotoh A., Gotoh Y., Taniguchi I., Nakamura K., Hayashi T., Katayama T., Uemura T., Hattori Y. Identification of key yeast species and microbe–microbe interactions impacting larval growth of *Drosophila* in the wild // eLife. — 2023. — Vol. 12. — Art. RP90148. DOI: 10.7554/eLife.90148.3
179. Murgier J., Everaerts C., Farine J.P., Ferveur J.F. Live yeast in juvenile diet induces species-specific effects on *Drosophila* adult behaviour and fitness // Scientific Reports. — 2019. — Vol. 9. — Art. 8873. DOI: 10.1038/s41598-019-45140-z
180. Najarro M.A., Sumethasorn M., Lamoureux A., Turner T.L. Choosing mates based on the diet of your ancestors: replication of non-genetic assortative mating in *Drosophila melanogaster* // PeerJ. — 2015. — Vol. 3. — Art. e1173. DOI: 10.7717/peerj.1173
181. Nandy B., Gupta V., Sen S., Udaykumar N., Samant M.A., Ali S.Z., Prasad N.G. Evolution of mate-harm, longevity and behaviour in male fruit flies subjected to different levels of interlocus conflict // BMC Evolutionary Biology. — 2013. — Vol. 13, No. 1. — Art. 212. DOI: 10.1186/1471-2148-13-212
182. Nuzhdin S.V., Pasyukova E.G., Dilda C.L., Zeng Z.B., Mackay T.F.C. Sex-specific quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster* //

- Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1997. — Vol. 94, No. 18. — P. 9734–9739. DOI: 10.1073/pnas.94.18.9734
183. Obadia B., Güvener Z.T., Zhang V., Ceja-Navarro J.A., Brodie E.L., Ja W.W., Ludington W.B. Probabilistic invasion underlies natural gut microbiome stability // *Current Biology*. — 2017. — Vol. 27, No. 13. — P. 1999–2006. DOI: 10.1016/j.cub.2017.05.034
184. Onuma T., Yamauchi T., Kosakamoto H., Kadoguchi H., Kuraishi T., Murakami T., Mori H., Miura M., Obata, F. Recognition of commensal bacterial peptidoglycans defines *Drosophila* gut homeostasis and lifespan // *PLoS Genetics*. — 2023. — Vol. 19, No. 4. — Art. e1010709. DOI: 10.1371/journal.pgen.1010709
185. Osborne A.J., Dearden P.K. A ‘phenotypic hangover’: the predictive adaptive response and multigenerational effects of altered nutrition on the transcriptome of *Drosophila melanogaster* // *Environmental Epigenetics*. — 2017. — Vol. 3, No. 4. — Art. dvx019. DOI: 10.1093/eep/dvx019
186. Ostrowski E.A., Ofria C., Lenski R.E. Ecological specialization and adaptive decay in digital organisms // *The American Naturalist*. — 2007. — Vol. 169, No. 1. — P. E1–E20. DOI: 10.1086/510211
187. Otárola-Jiménez J., Nataraj N., Bisch-Knaden S., Hansson B. S., Knaden M. Oviposition experience affects oviposition preference in *Drosophila melanogaster* // *iScience*. — 2024. — Vol. 27, No. 8. — Art. 110472. DOI: 10.1016/j.isci.2024.110472
188. Pais I.S., Valente R.S., Sporniak M., Teixeira L. *Drosophila melanogaster* establishes a species-specific mutualistic interaction with stable gut-colonizing bacteria // *PLoS Biology*. — 2018. — Vol. 16, No. 7. — Art. e2005710. DOI: 10.1371/journal.pbio.2005710
189. Partridge L., Alic N., Bjedov I., Piper M.D.W. Ageing in *Drosophila*: The role of the insulin/Igf and TOR signalling network // *Experimental Gerontology*. — 2011. — Vol. 46, No. 5. — P. 376–381. DOI: 10.1016/j.exger.2010.09.003

190. Partridge L., Fowler K. Direct and correlated responses to selection on age at reproduction in *Drosophila melanogaster* // Evolution. — 1992. — Vol. 46, No. 1. — P. 76–91. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1992.tb01986.x
191. Partridge L., Prowse N., Pignatelli P. Another set of responses and correlated responses to selection on age at reproduction in *Drosophila melanogaster* // Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. — 1999. — Vol. 266. — P. 255–261. DOI: 10.1098/rspb.1999.0630
192. Pasco M.Y., Léopold P. High Sugar-Induced Insulin Resistance in *Drosophila* Relies on the Lipocalin Neural Lazarillo // PLOS ONE. — 2012. — Vol. 7, No. 5. — Art. e36583. DOI: 10.1371/journal.pone.0036583
193. Peto R., Pike M.C., Armitage P., Breslow N.E., Cox D.R., Howard S.V., Mantel N., McPherson K., Peto J., Smith P.G. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and examples // British Journal of Cancer. — 1977. — Vol. 35. — P. 1–39. DOI: 10.1038/bjc.1976.220
194. Phelan J.P., Archer M.A., Beckman K.A., Chippindale A.K., Nusbaum T.J., Rose M.R. Breakdown in correlations during laboratory evolution. I Comparative analyses of *Drosophila* populations // Evolution. — 2003. — Vol. 57, No. 3. — P. 527–535. DOI: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb01544.x
195. Piškur J., Rozpędowska E., Polakova S., Merico A., Compagno C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? // Trends in Genetics. — 2006. — Vol. 22, No. 4. — P. 183–186. DOI: 10.1016/j.tig.2006.02.002
196. Pokrzywa M., Pawełek K., Kucia W.E., Sarbak S., Chorell E., Almqvist F., Wittung-Stafshede P. Effects of small-molecule amyloid modulators on a *Drosophila* model of Parkinson's disease // PLOS ONE. — 2017. — Vol. 12, No. 9. — Art. e0184117. DOI: 10.1371/journal.pone.0184117
197. Pourcelot E., Conacher C., Marlin T., Bauer F., Galeote V., Nidelet T. Comparing the hierarchy of inter- and intra-species interactions with population

- dynamics of wine yeast cocultures // FEMS Yeast Research. — 2023. — Vol. 23. — Art. foad039. DOI: 10.1093/femsyr/foad039
198. Powell J.R. Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model. — New York: Oxford University Press, 1997. — 562 p.
 199. Promislow D.E.L., Flatt T., Bonduriansky R. The biology of aging in insects: from *Drosophila* to other insects and back // Annual review of entomology. — 2022. — Vol. 67. — P. 83–103. DOI: 10.1146/annurev-ento-061621-064341
 200. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing // R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. — 2015. URL: <https://www.R-project.org/>
 201. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing // R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. — 2021. URL: <https://www.R-project.org/>
 202. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing // R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. — 2024. URL: <https://www.R-project.org/>
 203. Rauser C.L., Tierney J.J., Gunion S.M., Covarrubias G.M., Mueller L.D., Rose M.R. Evolution of late-life fecundity in *Drosophila melanogaster* // Journal of Evolutionary Biology. — 2006. — Vol. 19, No. 1. — P. 289–301. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2005.00966.x
 204. Reboud X., Bell G. Experimental evolution in *Chlamydomonas*. III. Evolution of specialist and generalist types in environments that vary in space and time // Heredity. — 1997. — Vol. 78, No. 5. — P. 507–514. DOI: 10.1038/hdy.1997.79
 205. Reichard M. Evolutionary ecology of aging: Time to reconcile field and laboratory research // Ecology and Evolution. — 2016. — Vol. 6, No. 9. — P. 2988–3000. DOI: 10.1002/ece3.2093
 206. Reisenman C.E., Scott K. Food-derived volatiles enhance consumption in *Drosophila melanogaster* // Journal of Experimental Biology. — 2019. — Vol. 222. — Art. jeb202762. DOI: 10.1242/jeb.202762

207. Remold S. Understanding specialism when the jack of all trades can be the master of all // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. — 2012. — Vol. 279, No. 1749. — P. 4861–4869. DOI: 10.1098/rspb.2012.1990
208. Ren C., Webster P., Finkel S., Tower J. Increased internal and external bacterial load during *Drosophila* aging without lifespan trade-off // *Cell Metabolism*. — 2007. — Vol. 6, No. 2. — P. 144–152. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.06.006
209. Reznick D.N., Bryant M.J., Roff D., Ghalambor C.K., Ghalambor D.E. Effect of extrinsic mortality on the evolution of senescence in guppies // *Nature*. — 2004. — Vol. 431. — P. 1095–1099. DOI: 10.1038/nature02936
210. Reznick D.N., Shaw F.H., Rodd F.H., Shaw R.G. Evaluation of the rate of evolution in natural populations of guppies (*Poecilia reticulata*) // *Science*. — 1997. — Vol. 275, No. 5308. — P. 1934–1937. DOI: 10.1126/science.275.5308.1934
211. Ridley E., Wong A., Westmiller S., Douglas A. Impact of the resident microbiota on the nutritional phenotype of *Drosophila melanogaster* // *PLOS ONE*. — 2012. — Vol. 7. — Art. e36765. DOI: 10.1371/journal.pone.0036765
212. Rolig A.S., Parthasarathy R., Burns A.R., Bohannan B.J.M., Guillemin K. Individual members of the microbiota disproportionately modulate host innate immune responses // *Cell Host Microbe*. — 2015. — Vol. 18, No. 5. — P. 613–620. DOI: 10.1016/j.chom.2015.10.009
213. Rose M. *Evolutionary Biology of Aging*. Oxford: Oxford University Press, 1991. — 234 p.
214. Rose M.R. Laboratory evolution of postponed senescence in *Drosophila melanogaster* // *Evolution*. — 1984a. — Vol. 38. — P. 1004–1010. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1984.tb00370.x
215. Rose M.R. Genetic covariation in *Drosophila* life history: Untangling the data // *The American Naturalist*. — 1984b. — Vol. 123, No. 4. — P. 565–569.

216. Rose M.R., Burke M.K., Shahrestani P., Mueller L.D. Evolution of ageing since Darwin // *Journal of Genetics*. — 2008. — Vol. 87, No. 4. — P. 363–371. DOI: 10.1007/s12041-008-0059-6
217. Rose M.R., Charlesworth B. Genetics of life history in *Drosophila melanogaster*. II. Exploratory selection experiments // *Genetics*. — 1981. — Vol. 97, No. 1. — P. 187–196. DOI: 10.1093/genetics/97.1.187
218. Rose M.R., Drapeau M.D., Yazdi P.G., Shah K.H., Moise D.B., Thakar R.R., Rauser C.L., Mueller L.D. Evolution of late-life fecundity in *Drosophila melanogaster* // *Evolution*. — 2002. — Vol. 56, No. 10. — P. 1982–1991. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2005.00966.x
219. Rosenberg E., Koren O., Reshef L., Efrony R., Zilber-Rosenberg I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution // *Nature Reviews Microbiology*. — 2007. — Vol. 5, No. 5. — P. 355–362. DOI: 10.1038/nrmicro1635
220. Rosenberg E., Sharon G., Zilber-Rosenberg I. The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework // *Environmental Microbiology*. — 2009. — Vol. 11, No. 12. — P. 2959–2962. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01995.x
221. Rudman S.M., Greenblum S., Hughes R.C., Rajpurohit S., Kiratli O., Lowder D.B., Lemmon S.G., Petrov D.A., Chaston J.M., Schmidt P. Microbiome composition shapes rapid genomic adaptation of *Drosophila melanogaster* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2019 — Vol. 116, No 40. — 20025–20032. DOI: 10.1073/pnas.1907787116
222. Rundle H.D., Nosil P. Ecological speciation // *Ecology Letters*. — 2005. — Vol. 8. — P. 336–352. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2004.00715.x
223. Ryu J.H., Ha E.M., Lee W.J. Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila* // *Developmental and Comparative Immunology*. — 2010. — Vol. 34, No. 4. — P. 369–376. DOI: 10.1016/j.dci.2009.11.010

224. Sagan L. On the origin of mitosing cells // Journal of Theoretical Biology. — 1967. — Vol. 14, No. 3. — P. 225–274. DOI: 10.1016/0022-5193(67)90079-3
225. Sannino D.R., Dobson A.J., Edwards K., Angert E.R., Buchon N. The *Drosophila melanogaster* gut microbiota provisions thiamine to its host // mBio. — 2018. — Vol. 9, No. 2. — Art. e00155-18. DOI: 10.1128/mBio.00155-18
226. Schretter C.E., Vielmetter J., Bartos I., Marka Z., Marka S., Argade S., Mazmanian S.K. A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in *Drosophila* // Nature. — 2018. — Vol. 563. — P. 402–406. DOI: 10.1038/s41586-018-0634-9
227. Sgrò C.M., Partridge L. A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila* // Science. — 1999. — Vol. 286. — P. 2521–2524. DOI: 10.1126/science.286.5449.2521
228. Shapiro R.S. Unearthing the story of the first antifungal drugs // Nature Reviews Microbiology. — 2023. — Vol. 21. — P. 631. DOI: 10.1038/s41579-023-00937-8
229. Sharon G., Segal D., Ringo J.M., Hefetz A., Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster* // PNAS. — 2010. — Vol. 107. — P. 20051–20056. DOI: 10.1073/pnas.1009906107
230. Shenoi V.N., Ali S.Z., Prasad N.G. Evolution of increased adult longevity in *Drosophila melanogaster* populations selected for adaptation to larval crowding // Journal of Evolutionary Biology. — 2016. — Vol. 29, No. 2. — P. 407–417. DOI: 10.1111/jeb.12795
231. Shin S.C., Kim S.H., You H., Kim B., Kim A.C., Lee K.A., Yoon J.H., Ryu J.H., Lee W.J. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling // Science. — 2011. — Vol. 334. — P. 670–674. DOI: 10.1126/science.1212782
232. Shirley M.D.F., Sibly R.M. Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster* // Evolution. —

1999. — Vol. 53, No. 3. — P. 826–836. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1999.tb05376.x
233. Shukla A.K., Johnson K., Giniger E. Common features of aging fail to occur in *Drosophila* raised without a bacterial microbiome // iScience. — 2021. — Vol. 24, No. 7. — P. 1–22. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102703
234. Silvertown J., Poulton P., Johnston E., Edwards G., Heard M., Biss P.M. The Park Grass Experiment 1856–2006: Its contribution to ecology // Journal of Ecology. — 2006. — Vol. 94, No. 4. — P. 801–804. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2006.01145.x
235. Simon J.C., Marchesi J.R., Mougél C., Selosse M.A. Host-microbiota interactions: From holobiont theory to analysis // Microbiome. — 2019. — Vol. 7, No. 1. DOI: 10.1186/s40168-019-0619-4
236. Sirot L.K., Wolfner M.F., Wigby S. Protein-specific manipulation of ejaculate composition in response to female mating status in *Drosophila melanogaster* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2011. — Vol. 108. — P. 9922–9926. DOI: 10.1073/pnas.1100905108
237. Sivunova D., Yakovleva E., Naimark E., Lysenkov S., Perfilieva K., Markov A. Adaptation of *Drosophila melanogaster* to high and low osmolarity promotes evolutionary change in the phenotypic plasticity of the larval anal organs // Biological Communications. — 2024. — Vol. 69, №3. — P. 149–161. DOI: 10.21638/spbu03.2024.303
238. Smith P., Willemsen D., Popkes M., Metge F., Gandiwa E., Reichard M., Valenzano D.R. Regulation of life span by the gut microbiota in the short-lived African turquoise killifish // eLife. — 2017. — Vol. 6. — Art. e27014. DOI: 10.7554/eLife.27014
239. Stamps J.A., Yang L.H., Morales V.M., Boundy-Mills K.L. *Drosophila* regulate yeast density and increase yeast community similarity in a natural substrate // PLOS ONE. — 2012. — Vol. 7, No. 7. — Art. e42238. DOI: 10.1371/journal.pone.0042238

240. Starmer W.T. A comparison of *Drosophila* habitats according to the physiological attributes of the associated yeast communities // *Evolution*. — 1981. — Vol. 35, No. 1. — P. 38–52. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1981.tb04856.x
241. Starmer W.T., Barker J.S.F., Phaff H.J., Fogleman J.C. Adaptations of *Drosophila* and yeasts: Their interactions with the volatile 2-propanol in the cactus–microorganism–*Drosophila* model system // *Australian Journal of Biological Sciences*. — 1986. — Vol. 39. — P. 69–77. DOI: 10.1071/BI9860069
242. Starmer W.T., Lachance M.A., Phaff H.J., Heed W.B. The biogeography of yeasts associated with decaying cactus tissue in North America, the Caribbean and northern Venezuela // *Evolutionary Biology*. — 1990. — Vol. 24. — P. 253–296.
243. Starmer W.T., Schmedicke R.A., Lachance M.A. The origin of the cactus-yeast community // *FEMS Yeast Research*. — 2003. — Vol. 3, No. 4. — P. 441–448. DOI: 10.1016/S1567-1356(03)00056-4
244. Stearns S.C. Life history evolution: Successes, limitations, and prospects // *Naturwissenschaften*. — 2000. — Vol. 87, No. 11. — P. 476–486. DOI: 10.1007/s001140050763
245. Stearns S.C., Ackermann M., Doebeli M., Kaiser M. Experimental evolution of aging, growth, and reproduction in fruitflies // *PNAS*. — 2000. — Vol. 97. — P. 3309–3313. DOI: 10.1073/pnas.97.7.3309
246. Steenackers H.P., Parijs I., Foster K.R., Vanderleyden J. Experimental evolution in biofilm populations // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2016. — Vol. 40, No. 3. — P. 373–397. DOI: 10.1093/femsre/fuw002
247. Stergiopoulos K., Cabrero P., Davies S.-A., Dow J.A.T. *Salty dog*, an SLC5 symporter, modulates *Drosophila* response to salt stress // *Physiological Genomics*. — 2009. — Vol. 37. — P. 1–11. DOI: 10.1152/physiolgenomics.90360.2008
248. Storelli G., Defaye A., Erkosar B., Hols P., Royet J., Leulier F. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing // *Cell Metabolism*. — 2011. — Vol. 14. — P. 403–414. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.07.012

249. Sugiyama H., Toyota T. Toward Experimental Evolution with Giant Vesicles // Life. — 2018. — Vol. 8, No. 4. — P. 53. DOI: 10.3390/life8040053
250. Taormina G., Mirisola M.G. Calorie restriction in mammals and simple model organisms // BioMed Research International. — 2014. — Vol. 2014. — Art. 308690. DOI: 10.1155/2014/308690
251. Tatar M., Chien S.A., Priest N.K. Negligible senescence during reproductive dormancy in *Drosophila melanogaster* // The American Naturalist. — 2001. — Vol. 158, No. 3. — P. 248–258. DOI: 10.1086/321320
252. Tatar M., Post S., Yu K. Nutrient control of *Drosophila* longevity // Trends in Endocrinology and Metabolism. — 2014. — Vol. 25, No. 10. — P. 509–517. DOI: 10.1016/j.tem.2014.02.006
253. Tatar M., Yin C. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms // Experimental Gerontology. — 2001. — Vol. 36, No. 4–6. — P. 723–738. DOI: 10.1016/S0531-5565(00)00238-2
254. Te Velde J.H., Molthoff C.F.M., Scharloo W. The function of anal papillae in salt adaptation of *Drosophila melanogaster* larvae // Journal of Evolutionary Biology. — 1988. — Vol. 1, No. 2. — P. 139–153. DOI: 10.1046/j.1420-9101.1988.1020139.x
255. Telang A., Wells M.A. The effect of larval and adult nutrition on successful autogenous egg production by a mosquito // Journal of Insect Physiology. — 2004. — Vol. 50, No. 7. — P. 677–685. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2004.05.001
256. Therneau T.M. A Package for Survival Analysis in R // R Foundation for Statistical Computing. — Version 3.2-13. — Vienna, 2021. — URL: <https://CRAN.R-project.org/package=survival>
257. Thomson J.M., Gaucher E.A., Burgan M.F., De Kee D.W., Li T., Aris J.P., Benner S.A. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast // Nature Genetics. — 2005. — Vol. 37. — P. 630–635. DOI: 10.1038/ng1553

258. Tobler R., Hermisson J., Schlötterer C. Parallel trait adaptation across opposing thermal environments in experimental *Drosophila melanogaster* populations // Evolution. — 2015. — Vol. 69, No. 7. — P. 1745–1759. DOI: 10.1111/evo.12705
259. Travers L.M., Garcia-Gonzalez F., Simmons L.W. Live fast die young life history in females: evolutionary trade-off between early life mating and lifespan in female *Drosophila melanogaster* // Scientific Report. — 2015. — Vol. 5. — Art. 15469. DOI: 10.1038/srep15469
260. Trindade R.C., Resende M.A., Silva C.M., Rosa C.A. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits // Systematic and Applied Microbiology. — 2002. — Vol. 25, No. 2. — P. 294–300. DOI: 10.1078/0723-2020-00089
261. Truman J.W., Riddiford L.M. The evolution of insect metamorphosis: a developmental and endocrine view // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. — 2019. — Vol. 374, No. 1783. — Art. 20190070. DOI: 10.1098/rstb.2019.0070
262. Tukey J. Comparing individual means in the analysis of variance // Biometrics. — 1949. — Vol. 5. — P. 99–114. DOI: 10.2307/3001913
263. Vandehoef C., Molaei M., Karpac J. Dietary adaptation of microbiota in *Drosophila* requires NF- κ B-dependent control of the translational regulator 4E-BP // Cell Reports. — 2020. — Vol. 31, No. 10. — Art. 107736. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107736
264. Verma T., Das S., Dhodi Lobo S., Mishra A.K., Bhattacharyya S., Nandy B. Evolution of mate harm resistance in females from *Drosophila melanogaster* populations selected for faster development and early reproduction // Journal of Evolutionary Biology. — 2024. — Vol., No. 1. P. 111–121. DOI: 10.1093/jeb/voae138
265. Via S., Lande R. Evolution of genetic variability in a spatially heterogeneous environment: effects of genotype–environment interaction // Genetical Research. — 1987. — Vol. 49, No. 2. — P. 147–156. DOI: 10.1017/S001667230002694X

266. Via S., Lande R. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity // *Evolution*. — 1985. — Vol. 39, No. 3. — P. 505–522. DOI: 10.2307/2408649
267. Vijendravarma R.K., Kraaijeveld A.R., Godfray H.C.J. Experimental evolution shows *Drosophila melanogaster* resistance to a microsporidian pathogen has fitness costs // *Evolution*. — 2009. — Vol. 63, No. 1. — P. 104–114. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2008.00516.x
268. Voolstra C.R., Suggett D.J., Peixoto R.S., Parkinson J.E., Quigley K.M., Silveira C.B., Sweet M., Muller E.M., Barshis D.J., Bourne D.G., Aranda M. Extending the natural adaptive capacity of coral holobionts // *Nature Reviews Earth & Environment*. — 2021. — Vol. 2. — P. 747–762. DOI: 10.1038/s43017-021-00214-3
269. Waddington C.H. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters // *Nature*. — 1959. — Vol. 183, No. 4676. — P. 1654–1655. DOI: 10.1038/1831654a0
270. Waddington C.H. Genetic assimilation of acquired characters // *Evolution*. — 1953. — Vol. 7. — P. 118–126. DOI: 10.2307/2405747
271. Walker R.S., Gurven M., Burger O., Hamilton M.J. The trade-off between number and size of offspring in humans and other primates // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. — 2008. — Vol. 275, No. 1636. — P. 827–833. DOI: 10.1098/rspb.2007.1511
272. Walters A.W., Hughes R.C., Call T.B., Walker C.J., Wilcox H., Petersen S.C., Rudman S.M., Newell P.D., Douglas A.E., Schmidt P.S., Chaston J.M. The microbiota influences the *Drosophila melanogaster* life history strategy // *Molecular Ecology*. — 2020. — Vol. 29, No. 3. — P. 639–953. DOI: 10.1111/mec.15344
273. Wang A., Singh A., Huang Y., Agrawal A.F. Ecological specialization in populations adapted to constant versus heterogeneous environments // *Evolution*. — 2019. — Vol. 73, No. 6. — P. 1309–1317. DOI: 10.1111/evo.13725

274. Wang Y., Burra S., Galiko M.J. *Drosophila* larval epidermal cells only exhibit epidermal aging when they persist to the adult stage // The Journal of Experimental Biology. — 2021. — Vol. 224, No. 9. — Art. jeb240986. DOI: 10.1242/jeb.240986
275. Waskom M.L. seaborn: statistical data visualization // Journal of Open Source Software. — 2021. — Vol. 6, No. 60. — Art. 3021. DOI: 10.21105/joss.03021
276. Wattiaux J.M. Cumulative parental age effects in *Drosophila subobscura* // Evolution. — 1968. — Vol. 22. — P. 406–421. DOI: 10.2307/2406539
277. Weaver S.C., Brault A.C., Kang W., Holland J.J. Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells // Journal of Virology. — 1999. — Vol. 73, No. 5. — P. 4316–4326. DOI: 10.1128/JVI.73.5.4316-4326.1999
278. Weismann A. *Essays upon Heredity and Kindred Biological Problems*. Oxford: Clarendon Press, 1889. — 473 p.
279. Wickham H. ggplot2 // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. — 2011. — Vol. 3, No. 2. — P. 180–185. DOI: 10.1002/wics.147
280. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D., François R., Grolemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the tidyverse // Journal of Open Source Software. — 2019. — Vol. 4, No. 43. — Art. 1686. DOI: 10.21105/joss.01686
281. Williams G.C. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence // Evolution. — 1957. — Vol. 11. — P. 398–411. DOI: 10.2307/2406060
282. Williams P.D., Day T. Antagonistic pleiotropy, mortality source interactions, and the evolutionary theory of senescence // Evolution. — 2003. — Vol. 57. — P. 1478–1488. DOI: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00356.x
283. Williams P.D., Day T., Fletcher Q., Rowe L. The shaping of senescence in the wild // Trends in Ecology and Evolution. — 2006. — Vol. 21. — P. 458–463. DOI: 10.1016/j.tree.2006.05.008

284. Wong A.N., Chaston J., Douglas A. The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis // The ISME Journal. — 2013. — Vol. 7. — P. 1922–1932. DOI: 10.1038/ismej.2013.86
285. Wong A.C., Luo Y., Jing X., Franzenburg S., Bost A., Douglas A.E. The host as the driver of the microbiota in the gut and external environment of *Drosophila melanogaster* // Applied and Environmental Microbiology. — 2015. — Vol. 81, No. 18. — P. 6232–6240. DOI: 10.1128/AEM.01442-15
286. Woods R.J., Barrick J.E., Cooper T.F., Shrestha U., Kauth M. R., Lenski R.E. Second-order selection for evolvability in a large *Escherichia coli* population // Science. — 2011. — Vol. 331. — P. 1433–1436. DOI: 10.1126/science.1198914
287. Yakovleva E., Danilova I., Maximova I., Shabaev A., Dmitrieva A., Belov A., Klyukina A., Perfilieva K., Bonch-Osmolovskaya E., Markov A. Salt concentration in substrate modulates the composition of bacterial and yeast microbiomes of *Drosophila melanogaster* // Microbiome Research Reports. — 2024. — Vol. 3. — P. 19. DOI: 10.20517/mrr.2023.56
288. Yamada R., Deshpande S.A., Bruce K.D., Mak E.M., Ja W.W. Microbes promote amino acid harvest to rescue undernutrition in *Drosophila* // Cell Reports. — 2015. — Vol. 10. — P. 865–872. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.01.018
289. Yamashita K., Oi A., Kosakamoto H., Yamauchi T., Kadoguchi H., Kuraishi T., Miura M., Obata F. Activation of innate immunity during development induces unresolved dysbiotic inflammatory gut and shortens lifespan // Disease Models & Mechanisms. — 2021. — Vol. 14, No. 9. — Art. dmm049103. DOI: 10.1242/dmm.049103
290. Yamauchi T., Oi A., Kosakamoto H., Akuzawa-Tokita Y., Murakami T., Mori H., Miura M., Obata F. Gut bacterial species distinctively impact host purine metabolites during aging in *Drosophila* // iScience. — 2020. — Vol. 23, No. 9. — P. 1–28. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101477

291. Zajitschek F., Zajitschek S., Bonduriansky R. Senescence in wild insects: key questions and challenges // *Functional Ecology*. — 2020. — Vol. 34. — P. 26–37. DOI: 10.1111/1365-2435.13399
292. Zeigler D.R., Nicholson W.L. Experimental evolution of *Bacillus subtilis* // *Environmental Microbiology*. — 2017. — Vol. 19, No. 9. — P. 3415–3422. DOI: 10.1111/1462-2920.13831
293. Zeyl C. Experimental evolution with yeast // *FEMS Yeast Research*. — 2006. — Vol. 6, No. 5. — P. 685–691. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00061.x
294. Zhang F., Wang L., Jin J., Pang Y., Shi H., Fang Z., Wang H., Du Y., Hu Y., Zhang Y., Ding X., Zhu Z. Insights into the genetic influences of the microbiota on the lifespan of a host // *Frontiers in Microbiology*. — 2023. — Vol. 14. — Art. 1138979. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1138979
295. Zhang M., Azad P., Woodruff R.C. Adaptation of *Drosophila melanogaster* to increased NaCl concentration due to dominant beneficial mutations // *Genetica*. — 2011. — Vol. 139. — P. 177–186. DOI: 10.1007/s10709-010-9535-z
296. Zheng J., Mutcherson R., Helfand S.L. Calorie restriction delays lipid oxidative damage in *Drosophila melanogaster* // *Aging Cell*. — 2005. — Vol. 4, No. 4. — P. 209–216. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2005.00159.x
297. Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2008. — Vol. 32. — P. 723–735. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x

ПРИЛОЖЕНИЕ

Примеры контрольных посевов (Тест 11) на дрожжевую микробиоту, развивающуюся на кормах в линиях Мн и Мбд, тестируемых на корме Н и на корме с посевом живых дрожжей одного из трех видов: *S. bacillaris*, *S. cerevisiae*, *Z. bailii*.



Мн на Н

Мбд на Н



Мн + *S. bacillaris*

Мбд + *S. bacillaris*



МН + *S. cerevisiae*

МБд + *S. cerevisiae*



МН + *Z. bailii*

МБд + *Z. bailii*