

УДК 575.1/2:574.2

СОЗДАНИЕ ЛИНИИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* СО СЦЕПЛЕННЫМИ МАРКЕРАМИ YW И ИЗУЧЕНИЕ ЕЁ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ

Жестков В.А., Сидорская В.А.

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет»
(Арзамасский филиал), Арзамас, e-mail: ezhestkova@mail.ru

В статье описана попытка создания линии *Drosophila melanogaster* со сцепленными маркерами по I хромосоме и изучения её генетические и экологические особенности. С этой целью был изучен вопрос мейотической рекомбинации; создана линия *Drosophila melanogaster* со сцепленными маркерами по I хромосоме – yw; изучены спонтанный кроссинговер по I группе сцепления, некоторые экологические показатели популяции линии yw (численность, половая пропорция). В заключение были сделаны следующие выводы: жизнеспособность кроссоверных самцов выше, чем рекомбинантных самок, что связано с полуживотностью мутаций y и w; спонтанный уровень кроссинговера между мутациями y и w составляет 1,69%, что соответствует месторасположению этих маркеров на генетической карте первой хромосомы; стерильность линии yw составила 40%; в потомстве от скрещивания yw/++ × yw/Y наблюдается уменьшение вторичной половой пропорции, что может свидетельствовать об относительно стабильных условиях существования популяции.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, кроссинговер, частота рекомбинации, половая структура популяции

CREATING LINES *DROSOPHILA MELANOGASTER* CO LINKED MARKERS YW AND STUDY OF ITS BIOLOGICAL FEATURES

Zhestkov V.A., Sidorskaya V.A.

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod (Arzamas Branch), Arzamas,
e-mail: ezhestkova@mail.ru

The paper describes an attempt to create *Drosophila melanogaster* lines with linked markers on chromosome I and the study of its genetic and environmental features. To this end, the issue has been studied meiotic recombination; established line of *Drosophila melanogaster* with linked markers on chromosome I - yw; I studied the spontaneous crossing over on I linkage group, some of the environmental indicators of the population line yw (size, sex ratio). In conclusion, the following conclusions were made: the viability of crossover males higher than females recombinant, due to the half-lethal mutations y and w; Spontaneous mutations level crossing over between y and w is 1.69%, which corresponds to the location of these markers on a genetic map of the first chromosome; yw sterility line was 40%; in the offspring of mating yw / ++ × yw / Y, a decrease of secondary sex ratio, which may indicate a relatively stable conditions of existence of the population. Proposed tasks that contribute to the development of cultural studies competence at younger schoolboys by means of obsolete words and collocations.

Keywords: the drosophila, crossover, frequencies recombination

В условиях современной жизни, когда необходимы решение вопросов экологической генетики и разработка новых тест-систем для определения потенциальной опасности новых веществ, количество которых увеличивается год от года, значительно возрос интерес к исследованиям на *Drosophila melanogaster* [10-13]. *Drosophila melanogaster* - один из наиболее распространённых модельных объектов, обладающих всеми качествами, необходимыми для успешного проведения генетического анализа: 1) незначительный срок развития от яйца до взрослой мухи (10 дней); 2) исключительно высокая плодовитость; 3) богатство наследственных рас или мутаций; 4) малое число хромосом ($2n=8$); 5) сходные с другими эукариотами пути метаболизма многих химических соединений [9].

Целью нашего исследования было создание линии *Drosophila melanogaster* со сцепленными маркерами по I хромосоме

и изучение её генетических (спонтанный кроссинговер) и экологических (численность, половая пропорция) особенностей.

В экспериментах использовалась линия yw – (y – yellow (желтое тело) – I, 0.0; w – white (белые глаза) – I, 1,5 и линия дикого типа Oregon-R) [3]. В лабораторных условиях культуры дрозофилы содержали в термостате при $t=24^{\circ}-25^{\circ}\text{C}$ на банановой среде. Для определения частоты спонтанного кроссинговера было поставлено 30 пробирочных культур, в которых одна виргильная самка yw/++ скрещивалась с одним самцом yw/Y. Эксперимент проводился в 5 повторностях, т.е. каждый раз родителей содержали вместе 5 дней, затем перебрасывали на новую питательную среду. В ходе исследования в потомстве велся учёт мух всех фенотипических классов, как среди самок, так и среди самцов. Потомство появилось только в 18 культурах. Учет дочернего поколения велся до полного вылета имаго. Частоты

рекомбинации определяли по результатам анализирующего скрещивания [9]. Оценивали значимость отклонения от теоретически ожидаемого результата методом χ^2 [6].

Явление кроссинговера было открыто на дрозофиле Т. Х. Морганом и оказалось общим для всех животных, растений, микроорганизмов [5, 8]. Современные модели кроссинговера являются производными от модели Холидея [12]. Модель Холидея включает следующие стадии: 1) разъединение полинуклеотидных цепей двойной спирали ДНК в каждой из двух гомологичных хроматид; 2) образование «гибридных» молекул ДНК, образующихся из полинуклеотидной цепи, принадлежащей одной хроматиде, и другой полинуклеотидной цепи, принадлежащей гомологичной хроматиде; 3) генную конверсию, возникающую в результате замены ошибочно вставленных оснований в «гибридных» молекулах ДНК. Из природы кроссинговера следует, что он должен включать разрывы молекул ДНК и затем синтез ДНК, необходимый для того, чтобы соединить разорванные молекулы, которые участвуют в кроссинговере.

Таким образом, существует следующий порядок событий для мейотического кроссинговера: вначале происходит образование разрывов в специфических участках молекул ДНК с помощью соответствующей эндонуклеазы. Затем возникают одноцепочные участки ДНК. Существует белок, который облегчает реассоциацию одноцепочных участков, и в конце концов все участки молекул ДНК, вовлечённые в кроссинговер, соединяются с помощью репарирующих механизмов [13].

Для того чтобы происходил кроссинговер и формировались хиазмы, необходимо присутствие синаптонемального комплекса [5]. Если синаптонемальный комплекс отсутствует в силу внешних или внутренних причин (т.е. в результате мутаций или экспериментального вмешательства), кроссинговер не происходит и хиазмы не формируются [12].

Частота мейотического кроссинговера (rf - frequencies recombination) зависит от многих факторов окружающей среды. Различные типы излучений: ультрафиолетовый свет, рентгеновские и γ -лучи, корпускулярное излучение, как правило, повышают частоту рекомбинации, вызывая одно- и двунитевые разрывы в ДНК хромосом [13]. Кроме того, частота рекомбинации может увеличиваться в популяциях, которые периодически подвергаются стрессовым воздействиям, а также связано с возрастом и полом особи [4].

Согласно одному из постулатов биологической эволюционной аксиомы, «эволю-

ция органического мира была бы невозможной без генетических рекомбинаций или событий, служивших их аналогами» [5]. Линейное расположение генов в хромосоме обеспечивает свободную комбинаторику генов. Если в одной хромосоме возникла полезная мутация, а в гомологичной хромосоме, пришедшей от другого родителя, также есть полезная мутация, но в другом локусе, то совместиться они могут только путем кроссинговера. Тогда такая рекомбинантная хромосома принесет популяции объединение двух полезных признаков [12].

Зависимость уровня рекомбинаций от среды можно рассматривать как оптимальную стратегию рекомбинационной системы, которая состоит в том, что достигается минимум рассеивания потенциальной генетической изменчивости, когда потребности в ней минимальны, т.е. в благоприятных условиях [13].

Линия yw была получена в результате следующих скрещиваний:

$$\begin{aligned} P: & \text{♀ } \frac{y^+}{y^+} \times \text{♂ } \frac{+w}{+w} \\ & \downarrow \\ F_1: & \text{♀ } \frac{y^+}{+w} \times \text{♂ } \frac{y^+}{+w} \\ & \downarrow \\ F_2: & \frac{y^+}{y^+}; \frac{++}{++}; \frac{y^+}{+w}; \frac{++}{++}; \\ & \frac{y^+}{+w}; \frac{y^+}{+w}; \frac{+w}{+w}; \frac{yw}{yw}; \end{aligned}$$

Из потомства F2 отбирали желтотелых белоглазых самцов ($\frac{yw}{yw}$) и скрещивали с желтотелыми красноглазыми самками ($\frac{y^+}{y^+}$ и $\frac{y^+}{yw}$). Самки $\frac{yw}{yw}$ в скрещивании с самцами давали поколение линии yw .

$$\begin{aligned} P: & \text{♀ } \frac{y^+}{yw} \times \text{♂ } \frac{yw}{yw} \\ & \downarrow \\ F_3: & \frac{y^+}{yw}; \frac{yw}{yw}; \frac{y^+}{yw}; \frac{yw}{yw} \end{aligned}$$

Из поколения F3 (2-го скрещивания) отбирали желтотелых белоглазых самцов и самок ($\frac{yw}{yw}$ и $\frac{yw}{yw}$) и ставили их на массовое размножение.

Изучение частоты спонтанного кроссинговера между генами желтое тело (y) и белые газа (w), находящимися I хромосоме, в мы проводили по следующему скрещиванию:

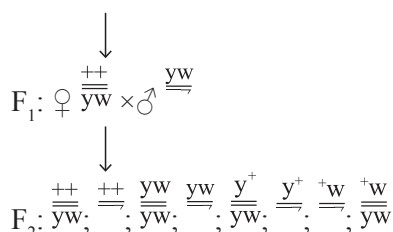
$$P: \text{♀ } \frac{yw}{yw} \times \text{♂ } \frac{++}{++}$$

Таблица 1

Уровень спонтанного кроссинговера у линии $uw/++$

№ культуры	5			11			15			17			18		
	♀	♂	Σ	♀	♂	Σ	♀	♂	Σ	♀	♂	Σ	♀	♂	Σ
rf (y-w)(%)	-	2,7	1,04	-	2,86	1,56	-	10	3,5	-	5,56	2,78	1,67	-	0,93
χ^2 (rfst=1,5%)	-	0,96	0,14	-	1,23	0,24	-	48,17	2,67	-	10,99	1,09	1,93	-	21,66
		-	-		-	-		+++	-		+++	-	-		+++

Условные обозначения: «+++» - достоверные отличия при $P<0,001$ ($\chi^2_{st}=10,89$) и $k=1$; «++» - при $P<0,01$ ($\chi^2_{st}=6,64$) $k=1$; «+» - при $P<0,05$ ($\chi^2_{st}=3,84$) $k=1$.



В ходе нашего исследования в потомстве велся учет мух всех фенотипических классов, как среди самок, так и среди самцов. Спонтанный кроссинговер определялся отдельно по мужским и женским особям, а также по всему потомству (таблица 1).

Из 18 пробирных культур только в 5 был зафиксирован кроссинговер, что составило 28%. Это возможно вследствие следующих причин: во-первых, из-за небольшой численности потомства, так как мутантная линия uw с двумя рецессивными мутациями обладает пониженной жизнеспособностью и, во-вторых, маленькое расстояние между генами y и w - 1,5% приводит к появлению небольшого числа рекомбинантного потомства.

Рассматривая кроссинговер у особей разного пола, отметим, что чаще он наблюдался в F_2 среди самцов (4 случая), нежели у самок (1 случай). Скорее всего отрицательную роль в этом феномене у гетерозиготных самок $+w/yw$ и $w+/yw$ вновь играет хромосома - анализатор uw , которая увеличивает смертность у её носителей. Самцы - гемизиготный пол (XY) не имеют X хромосомы с генами uw , Y-хромосома «вредного влияния» на кроссоверных мух не оказывает. Этими же причинами можно объяснить статистически более значимую величину

кроссинговера у самцов (rfcp=4,59%, +), чем у самок (rfcp=1,67%) - рекомбинантные особи женского пола чаще не выживают.

Если сравнивать частоту спонтанного кроссинговера у разных полов и величину общего кроссинговера со стандартным значением, определенным по генетической карте - 1,5%, мы выявляем следующее: у самцов она несколько выше, у самок находится в пределах нормы; среднее значение кроссинговера по всем культурам составляет 1,69, что статистически не отличается от табличного значения.

Рассматривая флуктуации показателей rf по повторностям (таблица 2) следует объяснить разную чувствительностью стадий оогенеза к внешним воздействиям [7].

Данные анализа, представленные в таблице 2, показывают, что в первой повторности отличия в высшей степени достоверны ($\chi^2_{ф}=25,96 > \chi^2_{ф}=16,27$), о чём свидетельствует высокое значение уровня рекомбинации rf (yw)=3,19% (табл. 2). Именно эта стадия на основе структурно - морфологических особенностей ядра в онтогенезе дрозофилы относится к ооцитам I класса клеток [7]. Данный класс включает клетки на синаптической стадии мейоза. Ядро таких клеток содержит синаптомембранный комплекс - основной атрибут кроссинговера. Поэтому закономерно, что ооциты на этой стадии являются рекомбиногенно чувствительным к любому внешнему и внутреннему воздействию. Следовательно, наиболее чувствительным этапом развития ооцитов является ранняя стадия их созревания.

Таблица 2

Значение χ^2 в каждой повторности на стандартной среде

№ повторности	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
rf	3,19	1,83	0,33	2,057	0,00
χ^2 (для rf=1,5%)	25,96(+++)	10,75(+)	5,77(-)	2,783(-)	14,584(++)

Условные обозначения: «+++» - достоверные отличия при $P<0,001$ ($\chi^2_{ф}=16,27$) и $k=3$; «++» - достоверные отличия при $P<0,01$ ($\chi^2_{ф}=11,34$) и $k=3$; «+» - достоверные отличия при $P<0,05$ ($\chi^2_{ф}=7,82$) и $k=3$; «-» - достоверных отличий нет.

В ходе эксперимента было поставлено 30 индивидуальных культур $uw/++ \times uw/Y$. Потомство дали 18 родительских пар, 12 культуры не развились вследствие стерильности одного или двух родителей (40%). На жизнеспособных мух могли повлиять мутации у и w, которые значительно снижают численность гомозиготных по этим генам самок, по сравнению с гетерозиготными особями. Из 18 культур в 13 случаях статистически достоверно преобладали мухи дикого типа, в 3 вариантах особи генотипа uw вовсе отсутствовали.

В нашем эксперименте вторичная половая пропорция (σ/φ) в 11 культурах была меньше 1, в 5 культурах - больше 1 и в 2 культурах равна 1. Общая численность самок - 668, самцов - 515, разница статистически достоверна ($\chi^2=19,8$ +++ при $P>0,001, k=1$). Такая диспропорция в сторону женского пола может свидетельствовать об относительно стабильных условиях существования популяции. Кроме того, согласно концепции В.А. Геодакяна, у самцов одна X-хромосома, а у самок 2 X-хромосомы, одна из которых может компенсировать поврежденный локус в гомологичной половой хромосоме, поэтому самки живут дольше и у них норма реакции шире, чем у самцов [2].

Проведённое исследование показало возможность использования линии *Drosophila melanogaster* uw в решении частных вопросов генетики и экологии.

Список литературы

1. Бочков Н.П. Клиническая генетика: учебник; под ред. Н.П. Бочкова. – 4-е изд. доп. и перераб. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2015. – 445 с.
2. Геодакян В.А. О структуре самовоспроизводящих систем // Сб. науч. трудов. – М.: Наука, 1972. – С. 371 – 379.
3. Захаров И.А. Генетические карты высших организмов. – Ленинград. изд-во: «Наука», 1979. – 215 с.
4. Имашёва А.Г. Стрессовые условия среды и генетическая изменчивость в популяции животных // Генетика. 1999. Т. 35. №4. С. 421 – 431.
5. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции: учебник для студентов высших учебных заведений. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. – 720 с.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа., 1990 – 352 с.
7. Левин В.Л., Шварцман П.Я. Гены детерминирующие развитие у дрозофилы. – М.: ВИНТИ, 1991. – 132 с.
8. Никольский В.И. Генетика. – М.: «Академия», 2010. – 56 с.
9. Орлова Н. Н. Генетический анализ / Н. Н. Орлова. – М.: Из-во МГУ, 1991. – 371 с.
10. Сидорская В.А. Изучение токсических эффектов мутагенов прямого и косвенного действия на линиях *Drosophila melanogaster* со совмещёнными маркерами // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2014. № 3 (62). Ч.1. С.36 – 38.
11. Сидорская В.А. Изучение экологических и генетических эффектов ацетилсалициловой кислоты и аскорбиновой кислоты *Drosophila melanogaster* // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2013. № 10 (57). Ч.1. С.36 – 38.
12. Чадов Б.Ф. Модель регуляции кроссинговера // Генетика. 1999. Т. 35. №4. С. 459 – 466.
13. Чубыкин В. Л. Модификация частоты кроссинговера и механизм хромосомного контроля распределения обменов у самок дрозофилы // Генетика. 1997. Т. 33. №9. С. 1189 – 1197.