

I Міжнародна конференція «ДРОЗОФИЛА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГЕНЕТИЦІ ТА БІОЛОГІЇ»
I Международная конференция «ДРОЗОФИЛА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕНЕТИКЕ И БИОЛОГИИ»
The 1st International conference "DROSOPHILA IN THE EXPERIMENTAL GENETICS AND BIOLOGY"

Влияние плотности культуры и изогенизации хромосом на проявление нестабильности признака *Bar* у *Drosophila melanogaster*
Л.А. Шакина, В.Ю. Страшнюк

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (Харьков, Украина)

Исследовали влияние плотности культуры и изогенизации хромосом 2, 3 на проявление генетической нестабильности признака вали *Drosophila melanogaster*. Установлено достоверное увеличение частоты неравного кроссинговера в локусе *Bar* в условиях перенаселенности культуры и при изогенизации хромосом 2, 3 дрозофилы. Показано снижение частоты ДЛМ при увеличении личиночной плотности и возрастание данного показателя в результате изогенизации хромосом.

Ключевые слова: дрозофила, неравный кроссинговер, доминантные летали, плотность культуры, изогенизация.

Все живые организмы в природе подвергаются воздействию разнообразных стрессовых факторов внешней и внутренней среды, способных вызывать как модификационные, так и наследственные изменения признаков. В последнее время появляются данные о том, что различные стрессовые воздействия способны индуцировать перемещения по геному мобильных генетических элементов, и, таким образом, генетические эффекты этих влияний на организмы могут реализовываться через нестабильные элементы генома (Гвоздев, 1998; Ратнер, Васильева, 2000).

Одним из факторов генетической нестабильности является неравный кроссинговер, или нерцепрокная гомологичная рекомбинация. Некоторые авторы рассматривают это явление в одном ряду с подвижными элементами генома, такими как транспозоны и ретропозоны (Гвоздев, 1998). Следствием неравного кроссинговера является возникновение нехваток или, наоборот, дубликаций отдельных участков генома. Дубликации открывают возможность возникновения новых генов и образования семейств генов. Неравный кроссинговер лежит в основе лабильности гетерохроматиновых районов хромосом, а также задействован в некоторых механизмах **репарации** генов. Существует много примеров, свидетельствующих о распространенности **этого** явления и его существенном вкладе в **эволюцию геномов** (Гвоздев, 1998; Сингер, Берг, 1998; Betrán, Long, 2002).

Впервые явление неравного кроссинговера было описано Стертевантом в 1925 г. при изучении мутаций признака *Bar* у дрозофилы (Sturtevant, 1925). Несколько ранее Зелени обнаружил нестабильность этого признака, ревертирующего к дикому типу с частотой 1 на 1000-2000 особей и мутирующего в *Ultrabar* с аналогичной частотой (Zeleny, 1921).

В то же время, мало что известно о влиянии генотипа и среды на частоту неравного кроссинговера. В частности, для нас представляло интерес исследование действия на этот процесс стресса, обусловленного перенаселенностью культуры, и такого негативного с точки зрения приспособленности фактора как изогенизация хромосом.

Целью работы было изучить влияние генетических и средовых факторов на проявление генетической нестабильности признака *Bar* у дрозофилы. В задачи работы входило исследование частоты мутирования этого признака в зависимости от генетического фона линии, изогенизации хромосом и влияния плотности культуры.

Объекты и методы исследования

Исследования проводили на неселектируемой аутбредной линии *Bar*, линии *Bares*, полученной путем восьми насыщающих возвратных скрещиваний мух линии *Bar* с мухами линии *Canton-S* (*CS*), а также линии *Bar_{cs}*, изогенной по хромосомам 2, 3. Мутация *Bar* (*B*) (локализация 1-57.0) -тандемная дубликация 16A1-16A7 области, фенотипически проявляется в редукции глаз до узкой вертикальной полосы с количеством фасеток около 90 у самцов и 70 у самок, в отличие от нормального количества около 740 и 780 фасеток для самцов и самок соответственно (Lindsley, Grell, 1968).

В результате рекомбинации между неправильно спаренными копиями генов в пределах дубликации *Bar* образуются нерцепрокные рекомбинантные хромосомы с тремя (т.е. *Double Bar* (*B?* или *Ultrabar*) = *BB*) и одной (реверсия к нормальному фенотипу) копиями гена

**Секція 1. Загальна генетика дрозофіли.
Секция 1. Общая генетика дрозофилы.
Section 1. General Genetics of Drosophila.**

соответственно (Сингер, Берг, 1998). Особи с нерцепрокными рекомбинантными хромосомами имеют мутантный (*S/+*, *BB/Y*, *BB/B*) и нормальный (*+/Y*) фенотип. Самки *B/+* содержат около 350 фасеток и имеют выемку на переднем крае глаза, что приводит к формированию почечновидного глаза. У мутантов *Double Bar* ($\beta\beta$) количество глазных фасеток уменьшено приблизительно до 45 у гетерозигот *BB/B* и до 25 у гомозигот *BB/Y* (Lindsley, Grell, 1968).

Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой среде при температуре $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Культуры дрозофилы развивались в сахарных стаканчиках диаметром 2,0 см и высотой 10,0 см. Объем питательной среды в каждом стаканчике составлял 5,0 мл.

Плотность культуры задавали количеством пар родительских особей на один стаканчик: 1 пара (контроль) и 7 пар (опыт). Изогенизацию хромосом проводили согласно классической схеме с использованием линии-балансера *Cy/Pm;D/Sb* (Тихомирова, 1990).

Частоту мутирования в локусе *Var* определяли по отношению числа мутантных событий *+/Y*, *B/+*, *BB/Y*, *BB/B* к общему числу проанализированных особей линии *Var*. В каждом варианте опыта исследовано 3 - 5 тыс. имаго. Частоту ДЛМ определяли согласно стандартной методике (Тихомирова, 1990). Экспрессивность признака бал оценивали по количеству фасеток, в каждом варианте эксперимента было проанализировано от 48 до 92 особей.

Результаты экспериментов обработаны методами математического анализа (Лакин, 1990).

Результаты и обсуждение

В табл. 1, 2 приведены результаты исследований влияния плотности культуры и процесса изогенизации хромосом 2, 3 на частоту неравного кроссинговера в локусе *Val*. Показано 4-кратное возрастание частоты неравного кроссинговера в неселектируемой линии *Var* в условиях личиночного перенаселения ($P > 0,99$) относительно контроля. Увеличение частоты неравного кроссинговера установлено также для линии *Bares*, изогенной по хромосомам 2, 3, на 151,53 % ($P > 0,95$) относительно линии *Bares* (контроль). Достоверных отличий между линиями *Val* и *Bares* по изучаемому показателю не обнаружено.

Таблица 1.
Влияние плотности культуры на мутационный процесс в линии *Var D. melanogaster*

Плотность культуры (количество пар родительских особей)	Частота неравного кроссинговера в локусе <i>Val</i>	Частота ДЛМ, %
1	$1,01 \cdot 10^{-3} \pm 0,50 \cdot 10^{-3}$	45,82 ± 1,32
7	$4,00 \cdot 10^{-3} \pm 0,87 \cdot 10^{-3}$	41,23 ± 1,16

Таблица 2.
Влияние изогенизации хромосом 2, 3 на мутационный процесс у *D. melanogaster*

Линии	Частота неравного кроссинговера в локусе <i>Val</i>	Частота ДЛМ, %
C-S	-	14,95 ± 1,45
<i>Bares</i>	$1,96 \text{Ю}^{\wedge} \pm 0,08 \text{Ю}^{\text{``}}$	44,05 ± 1,53
<i>Var_{C,S}</i> , изогенная по хромосомам 2, 3	$4,93 \text{Ю}^{\text{``}} \pm 1,05 \text{Ю}^{\text{``}}$	52,21 ± 2,29

В связи с проведенными исследованиями возникает вопрос о возможных механизмах влияния перенаселенности культуры и изогенизации хромосом *D. melanogaster* на частоту мутирования в локусе *Val*. Поскольку реализация процесса неравного кроссинговера возможна, когда происходит рекомбинация между неправильно спаренными копиями генов, то можно предположить, что частота этого явления зависит от нарушения правильной гомологичной конъюгации рекомбинирующих хромосом и частоты двунитевых разрывов ДНК на участке неаллельного гомологичного спаривания.

Иной аспект влияния стрессовых факторов на частоту неравного кроссинговера может быть связан с перемещением мобильных генетических элементов (МГЭ). Показано, что увеличение частоты рекомбинации в ряде случаев связано с транспозицией посредством

Пл. Шакина, В.Ю. Страшнюк

Влияние плотности культуры и изогенизации хромосом на проявление неустойчивости признака *Var* у *Drosophila melanogaster*

I Міжнародна конференція «ДРОЗОФИЛА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГЕНЕТИЦІ ТА БІОЛОГІЇ»
I Международная конференция «ДРОЗОФИЛА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕНЕТИКЕ И БИОЛОГИИ»
The 1st International conference "DROSOPHILA IN THE EXPERIMENTAL GENETICS AND BIOLOGY"

ДНКового интермедиатора, при этом разрывы ДНК в сайте внедрения инсерций могут инициировать рекомбинационные события (Юрченко и др., 1997). На основании рестрикционного анализа (Tsubota, 1989) показано, что различные линии *Val* содержат транспозирующийся элемент, идентифицированный как *roo* или *B104* элемент, отделяющий две копии дупликации *Bar*. Сам *B104 (roo)* элемент относится к группе *BEL* семейства *roo* LTR ретротранспозонов в пределах генома *D. melanogaster* (Bowen, McDonald, 2001) и транспозируется посредством РНКового интермедиатора, не индуцируя разрывы ДНК, которые могли бы инициировать рекомбинационное событие. Однако 5' конец *B104* элемента является «горячим» сайтом инсерций других транспозирующихся элементов (Tsubota, 1989). Учитывая тот факт, что процесс изогенизации, наряду с ν -облучением, тяжелым тепловым шоком, этанолом является наиболее мощным индуцирующим воздействием, сопровождающимся массовыми перемещениями копий МГЭ (Ратнер, Васильева, 2000), приведенная выше схема увеличения частоты неаллельной рекомбинации в локусе *Bar* представляется вполне вероятной.

Поскольку следствием личиночного перенаселения является высокая смертность на предимагинальных стадиях развития (Лучникова, 1978), а причиной угнетения жизненных функций при изогенизации хромосом является выщепление в гомозиготной форме различных дефектных генов, представляло интерес исследование влияния плотности культуры и изогенизации хромосом на частоту возникновения ДЛМ (табл. 1, 2). Показано достоверное снижение частоты ДЛМ при увеличении плотности культуры в линии *Bar* от одной до семи пар родительских особей на 10,02 % ($P > 0,99$). В работе отмечено также увеличение частоты эмбриональной смертности в линии *Bar_{c,s}* изогенной по хромосомам 2,3, относительно контроля (линия *Bares*) на 18,52 % ($P > 0,99$).

Следует заметить, что линии *Bar* и *Bares* отличаются повышенным уровнем частоты ДЛМ по сравнению с линией дикого типа (C-S), для которой соответствующий показатель составил $14,95 \pm 1,45$ %. Таким образом, высокий уровень ДЛМ в линиях *Bar* и *Bar_{c,s}* в значительной степени определяется присутствием гена *Bar* и свидетельствует о том, что частота мутирования в локусе *Bar* в действительности может существенно превышать уровень, фиксируемый в эксперименте.

Согласно современным данным, ген *Bar* взаимодействует с 13-ю генами и как минимум шесть из них (*br*, *E(B)*, *E(B)2A*, *Low*, *oro*, *ptc*) обладают рецессивным летальным эффектом (<http://flvbase.bio.indiana.edu>). В наших экспериментах мы обнаружили, что неравный кроссинговер в локусе *Bar* в ряде случаев приводит к летальному эффекту. При скрещивании самок *V/+*, утративших копию гена *Bar* в результате неравного кроссинговера, с самцами *V/U*, среди ожидаемых классов мух *V/+*, *V/B*, *+/Y*, *V/U* отсутствовали мухи *+/Y* генотипа. В то же время самцы *+/Y*, возникающие в результате неаллельной рекомбинации хромосом, вполне жизнеспособны и, вероятно, несут иную копию гена *Bar*, не обладающую рецессивным летальным эффектом. Аналогично, при скрещивании самок *+/+*, полученных от скрещивания особей с нерцепрокными рекомбинантными хромосомами *V/+* и *+/Y*, с самцами *V/U* вместо ожидаемого соотношения классов 1 *V/+* : 1 *+/Y* получали соотношение 2 *V/+* : 1 *+/Y*, т.е. половина самцов неслетальна по X-хромосоме. Подобного эффекта не наблюдалось при скрещивании самок *+/+* дикого типа (линия C-S) с самцами *V/U*. Приведенные данные, наряду с известными литературными данными, могут объяснять высокую эмбриональную смертность в линиях *Bar* и *Bares*.

Выводы

Таким образом, в работе показано достоверное увеличение частоты неравного кроссинговера в локусе *Bar* при возрастании перенаселенности культуры и изогенизации хромосом 2, 3. Выявлено снижение частоты ДЛМ при увеличении личиночной плотности и возрастание данного показателя в результате изогенизации хромосом 2, 3. Полученные данные свидетельствуют о том, что действие физиологического и генетического стресса может быть важным источником повышения генетической изменчивости вследствие увеличения генетической нестабильности некоторых локусов.

Список литературы

Гвоздев В.А. Подвижная ДНК эукариот. Часть 2. Роль в регуляции активности генов и эволюции генома // Соросовский образовательный журнал. - 1998. - № 8. - С. 15.

15-20 вересня 2008 року

15-20 сентября 2008 года

September 15-20 2008

Секція 1. Загальна генетика дрозофіли.
Секция 1. Общая генетика дрозофилы.
Section 1. General Genetics of Drosophila.

Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: Высш. школа, 1990. - 352с.

Лучникова Е.М. Регуляция численности и структуры популяции у дрозофилы / Дрозофила в экспериментальной генетике. - Новосибирск: Наука, 1978. - 288с.

Ратнер В.А., Васильева Л.А. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов стрессовыми воздействиями // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - Т. 6, № 6. - С. 14-20.

Сингер М., Берг П. Гены и геномы. - М.: Мир, 1998. - 373с.

Тихомирова М.М. Генетический анализ. - Л.: Издательство ЛГУ, 1990. - 280с.

Юрченко Н.Н., Тэм Л.-Й., О'Хэа К., Захаров И.К. Влияние транспозона в локусе *singed* на рекомбинацию у *Drosophila melanogaster* // Генетика. - 1997. - Т. 33, № 3. - С. 333-338.

Betran E., Long M. Expansion of genome coding regions by acquisition of new genes // *Genetica*. - 2002.-Vol. 115.-P. 65-80.

Bowen N.J., McDonald J.F. *Drosophila* euchromatic LTR retrotransposons are much younger than the host species in which they reside // *Genome research*. - 2001. - Vol. 11, № 9. - P. 1527-1540.

Lindslev D.L., Grell E.H. Genetic variations of *Drosophila melanogaster* // *Carnegie Inst. Wash. Publ.* - 1968.-627p.

Sturtevant A.H. The effects of unequal crossing over at the bar locus in *Drosophila* // *Genetics*. - 1925.-Vol. 10.-P. 117-147.

Tsubota S.I., Rosenberg P., Szostak H. et al. The cloning of the *Bar* region and the B breakpoint in *Drosophila melanogaster*. evidence for a transposon-induced rearrangement // *Genetics*. - 1989. - Vol. 122. - P. 881-890.

Zeleny C The direction and frequency of mutation in the bar-eye series of multiple allelomorphs of *Drosophila* // *J. Exptl. Zool.* - 1921. - Vol. 34. - P. 203-233.

<http://flybase.bio.indiana.edu>

Summary. The influence of culture density and isogenization of chromosomes 2, 3 on the manifestation of the genetic instability at the *Bar* locus, and frequency of the dominant lethal mutations (DLM) in *Drosophila melanogaster* was investigated. It was found that the culture crowding and isogenization of chromosomes 2, 3 resulted in the reliable increase of the unequal crossing over frequency at the *Bar* locus. It was shown that the DLM frequency decreased in conditions of culture crowding and increased in consequence of isogenization of chromosomes.

Резюме. Досліджували вплив щільності культури та ізогенізації хромосом 2, 3 на прояв генетичної нестабільності в локусі *Bar* і частоту домінантних летальних мутацій (ДЛМ) у *Drosophila melanogaster*. Встановлено достовірне збільшення частоти нерівного кросинговера в локусі *Bar* за умов перенаселення культури та ізогенізації хромосом 2, 3. Показано зниження частоти ДЛМ зі збільшенням личинкової щільності і зростання даного показника в результаті ізогенізації хромосом.