

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
АСТРАХАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

М.Ф. КОЗАК

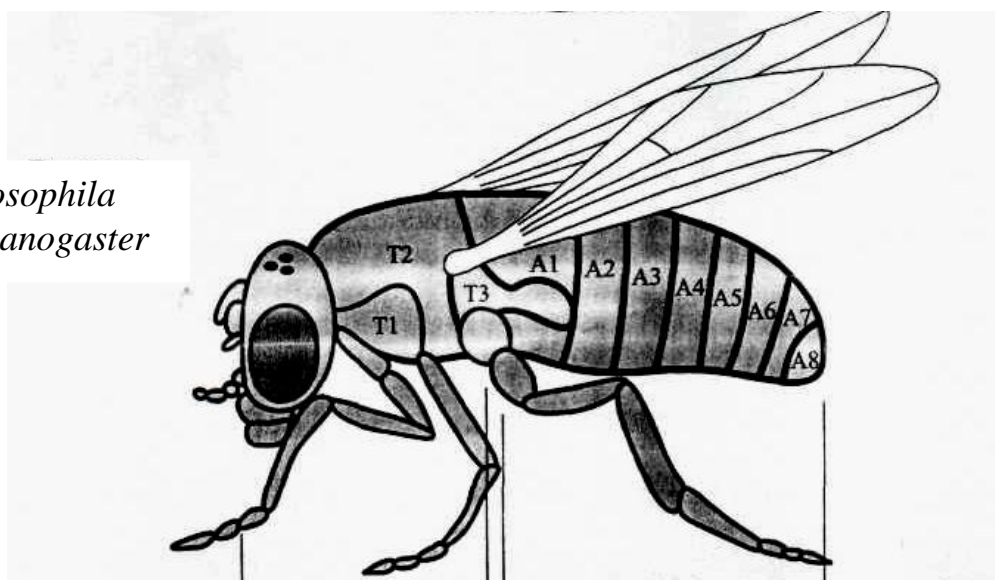
ДРОЗОФИЛА – МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ГЕНЕТИКИ

Учебно-методическое пособие

для студентов, обучающихся по специальностям

020201 Биология,
020803 Биоэкология,
050102 Биология
510600 Биология

*Drosophila
melanogaster*



Издательский дом «Астраханский университет» 2007

ББК 28.0
К 59

**Рекомендовано к печати редакционно-издательским советом
Астраханского государственного университета**

Рецензенты

доктор биологических наук, профессор *В.П. Иванов*
(Астраханский государственный технический университет);
доктор биологических наук, профессор *Якубов Ш.А.*
(Астраханский государственный технический университет)

Козак М.Ф.

Дрозофила - модельный объект генетики [Текст]: учебно-методическое пособие М.Ф. Козак. - Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2007. – 87, [3] с.

Дрозофиле, как объекту генетических исследований, принадлежит выдающаяся роль в разработке важнейших проблем современной генетики, которая в процессе развития генетики со временем не уменьшается, а увеличивается вместе с ростом интегральной роли генетики в системе биологических наук. Пособие содержит схемы и методику постановки важнейших опытов по программе практического курса «Генетика» и краткий обзор ряда современных исследований на дрозофиле, имеющих прямое отношение к решению фундаментальных закономерностей генетики.

Пособие составлено на основе использования личного опыта автора по организации дрозофильного практикума, опыта других университетов и предназначено для студентов и преподавателей биологических, медицинских, педагогических, аграрных специальностей университетов и институтов.

Постановка классических опытов на модельном объекте генетики – дрозофиле – способствует самостоятельному изучению курса генетики и формирует качества биолога-исследователя любой области деятельности.

ISBN 978-9926-0014-8

© Козак М.Ф. , 2007
© Издательский дом «Астраханский университет», 2007

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	5
1.ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДРОЗОФИЛЫ.....	8
1.1.Жизненный цикл дрозофилы.	
1.2.Яйцо и оплодотворение у дрозофилы.	
1.3.Личинка.	
1.4.Куколка.	
1.5.Имаго.	
1.6. Признаки полового диморфизма взрослых особей дрозофилы.	
1.7. Генетическая детерминация раннего эмбрионального развития дрозо- филы	
2. ПОДДЕРЖАНИЕ ЛИНИЙ.	18
2.1. Состав среды для дрозофилы.	
2.2. Процесс подготовки среды для дрозофилы	
2.3. Обработка пробирок.	
2.4. Оборудование рабочего места для работы с дрозофилой	
3. ПОСТАНОВКА СКРЕЩИВАНИЙ В СИСТЕМЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.....	22
3.1. Генетический анализ.	
3.2.Хромосомы дрозофилы, использование политенных хромосом в гене- тическом анализе.	
3.3. Методика постановки отдельных скрещиваний и используемые линии дрозофилы	
3.3.1. Моногибридное скрещивание	
3.3.2. Дигибридное скрещивание.	
3.3.3. Взаимодействие генов.	
3.3.4. Наследование признаков, сцепленных с полом.	
3.3.5. Установление группы сцепления генов.	
3.3.5.1. Определение группы сцепления генов с помощью рецессивных мар- керов.	
3.3.5.2. Определение группы сцепления генов с помощью доминантных маркеров.	

3.3.6. Кроссинговер. Локализация гена в группе сцепления.

3.3.6.1. Кроссинговер в X-хромосоме дрозофилы.

3.3.6.2. Кроссинговер в аутосоме.

3.3.7. Классический метод локализации мутаций.

4. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И УЧЁТА ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ...45

4.1. Метод Мёллер-5. Обнаружение рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций у дрозофилы (метод Vasc).

4.2. Использование метода Мёллер-5 для учёта летальных мутаций (абберации хромосом и генные мутации) с помощью цитогенетического анализа.

4.2.1. Анализ временных препаратов политенных хромосом клеток слюнных желез дрозофилы (для идентификации хромосомных перестроек).

4.3. ПОЛУЧЕНИЕ МУТАЦИЙ И ТЕСТИРОВАНИЕ ИХ НА АЛЛЕЛИЗМ.

5. ГОМОЛОГИЯ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ РАННЕЕ РАЗВИТИЕ ДРОЗОФИЛЫ И ДРУГИХ ОРГАНИЗМОВ.....56.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....64

7. ПРИЛОЖЕНИЕ.....67

Библиографический список.....83

ВВЕДЕНИЕ

Методы исследования генетики условно можно разделить на три группы: эмпирические, экспериментальные и теоретические. При эмпирическом подходе проводят обширные исследования генетической изменчивости действия отдельного гена или группы генов в популяциях в течение определённого времени. При этом учитывают влияние среды на генетическую изменчивость, которая в таких эмпирических работах включает морфологическую изменчивость признаков, изменчивость кариотипа, изменчивость изоферментов, полиморфизм ДНК. Обнаруженный в эмпирических исследованиях генетический полиморфизм понятен лишь на первый взгляд. В действительности, он требует дальнейшего всестороннего анализа. Гипотезы, вытекающие из эмпирических данных о влиянии различных факторов на уровень и характер генетической изменчивости, нуждаются в экспериментальной проверке. Используя данные эмпирических и экспериментальных исследований, можно построить обобщённую теоретическую модель, учитывающую все данные наблюдений и экспериментов. Взаимосвязь между тремя типами методов исследований в генетике иллюстрирует рис 1.

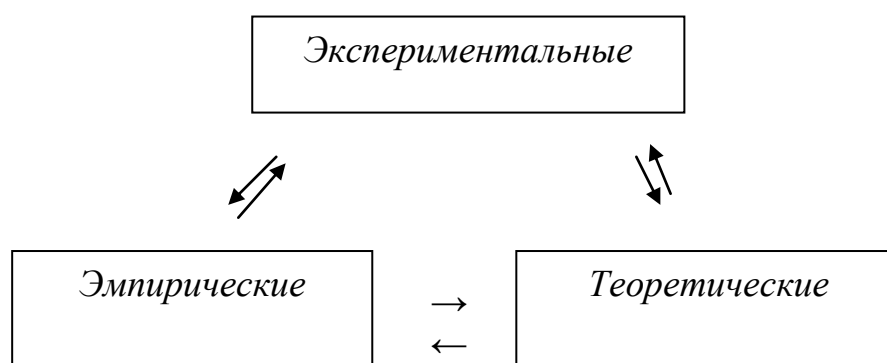


Рис. 1. Взаимосвязь между эмпирическими, экспериментальными и теоретическими методами генетики.

Как правило, сначала поступает эмпирическая информация, затем строится гипотеза, объясняющая полученные результаты. После этого планируются и проводятся эксперименты, подтверждающие или опровергающие данную гипотезу. Для расширения научных знаний необходимы альтернативные гипотезы и «критические» эксперименты. Подобные логически обусловленные эксперименты с альтернативными результатами позволяют исключить одну (или несколько) из альтернативных гипотез.

При разработке (планировании) и выполнении экспериментов необходимо учитывать следующие моменты:

- соответствующее количество независимых повторных экспериментов;

- проведение контрольных экспериментов;
- объём выборочных совокупностей, количество наблюдений и экспериментов должны быть достаточными для того, чтобы вероятность статистических отклонений была допустима.

Фундаментальные генетические закономерности были открыты на модельных организмах в серии контролируемых экспериментов. К ним относятся продемонстрированные на горохе законы (правила) расщепления и независимого наследования признаков (И. Грегора Менделя). Исследования на другом *модельном объекте генетики* *Drosophila melanogaster* привели к разработке хромосомной теории наследственности, теории генетической детерминации пола, открытию механизмов возникновения мутаций, разработке методов их количественной оценки. Большое количество спонтанных мутаций было открыто Т.Г. Морганом и Х.Дж. Мёллером. На дрозофиле изучено действие радиации на наследственность, проведены исследования в области популяционной и эволюционной генетики. Глубокое изучение генетики дрозофилы и овладение практическими навыками постановки и проведения генетического эксперимента являются введением в научно-исследовательскую и практическую деятельность будущего специалиста-биолога.

Модель (в современном понимании) – словесное (вербальное), графическое или математическое описание реальных событий. Выдвигаются следующие требования к модели:

- соответствие описанию природных процессов;
- согласование с реальными наблюдениями.

Экспериментальные данные, полученные на модельных объектах в лабораторных условиях, не всегда могут отражать влияние сложных и многообразных факторов, действующих в естественных природных системах. При слишком строгом эксперименте с множеством ограничений исследователь получает только теоретическую модель, которая не даёт исчерпывающей информации о природных популяциях. При опытной проверке того или другого явления в естественных, не вполне контролируемых условиях, результаты эксперимента могут быть недостаточно чёткими для выбора альтернативных гипотез. Очевидна необходимость взаимосвязи между эмпирическими, экспериментальными и теоретическими методами научно-исследовательской работы в генетике (как и других областях). Изучение классических опытов на модельных объектах в вузовских практических курсах является важнейшим условием формирования биолога-исследователя.

Дрозофиле, как объекту генетических исследований, в лабораторных условиях (а также в природе) принадлежит выдающаяся роль в разработке широкого круга проблем современной генетики. В качестве объекта исследования она впервые была использована Карпентером в начале XX века. В дальнейшем ряд авторов изучали на ней влияние инбридинга, условий со-

держания. Опыты с дрозофилой были начаты Т.Г. Морганом в 1909 году, в 1910 году им была обнаружена первая спонтанная мутация у дрозофилы, затем создана первая мутационная линия: *white*, *w* (белые глаза). В его лаборатории (вместе с К. Бриджесом, Дж. Мёллером и А.Г. Стертевантом) были выведены другие мутационные линии дрозофилы. Наряду с генетическим, они проводят цитологический анализ хромосом дрозофилы. С того момента до настоящего времени дрозофила является модельным объектом большинства генетических лабораторий мира.

1. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДРОЗОФИЛЫ

Дрозофила *Drosophila melanogaster*, также имеет название плодовая, банановая, уксусная муха. Класс *Insecta*, отряд *Diptera*, семейство *Drosophilidae*. В природе обитает «дикий *mun* - *wild type*» дрозофилы (нормальный, *Normal*). Признаки особей дикого типа: серое тело, нормальные крылья, красные глаза. Размеры её тела (обычно 2-3 мм) зависят от типа питания и других внешних условий.

Особенности дрозофилы, которые делают её удобным модельным объектом генетики:

- Небольшой период развития (10-14 дней). В течение одного месяца можно получить 3 поколения мух.
- Высокая плодовитость (от одной пары особей можно получить от 100 до 175 потомков).
- Малое число хромосом ($2n = 8$). Наличие в клетках слюнных желёз личинок дрозофилы полигенных хромосом.
- Удобство разведения в лабораторных условиях.
- Большое число легко различимых изученных признаков.
- Высокий процент изученных генов, определяющих легко различимые признаки.

К числу органов (и признаков) дрозофилы, наиболее часто подверженных мутационным изменениям, относятся признаки глаз, крыльев, щетинок. Глаза дрозофилы классифицируют как сложные, фасеточные. Число фасеток (*омматидий*) глаз у самок дрозофилы дикого типа составляет около 780, у самцов около 740. Мутации затрагивают различные признаки глаз: наиболее часто они изменяют их пигментацию, усиливая цвета до бордо или ослабляя до белого со всевозможными переходами (эозиновый, абрикосовый, розовый, вишнёвый, коралловый, карминовый и другие).

Ряд мутаций приводят к полной или частичной редукции фасеток глаз: *Bar* (полосковидный), *Lobe* (лопастный), *eyeless* (безглазый) и другие. Редукция чувствительных элементов глаз у дрозофилы сопровождается преобразованием соответствующих отделов мозга, уменьшением размеров головы. Многочисленные мутации связаны с изменениями признаков крыла, затрагивающими его конфигурацию, жилкование, размеры и другие признаки.

1.1. Жизненный цикл дрозофилы

Drosophila melanogaster является насекомым с полным превращением (рис 1.1.1).

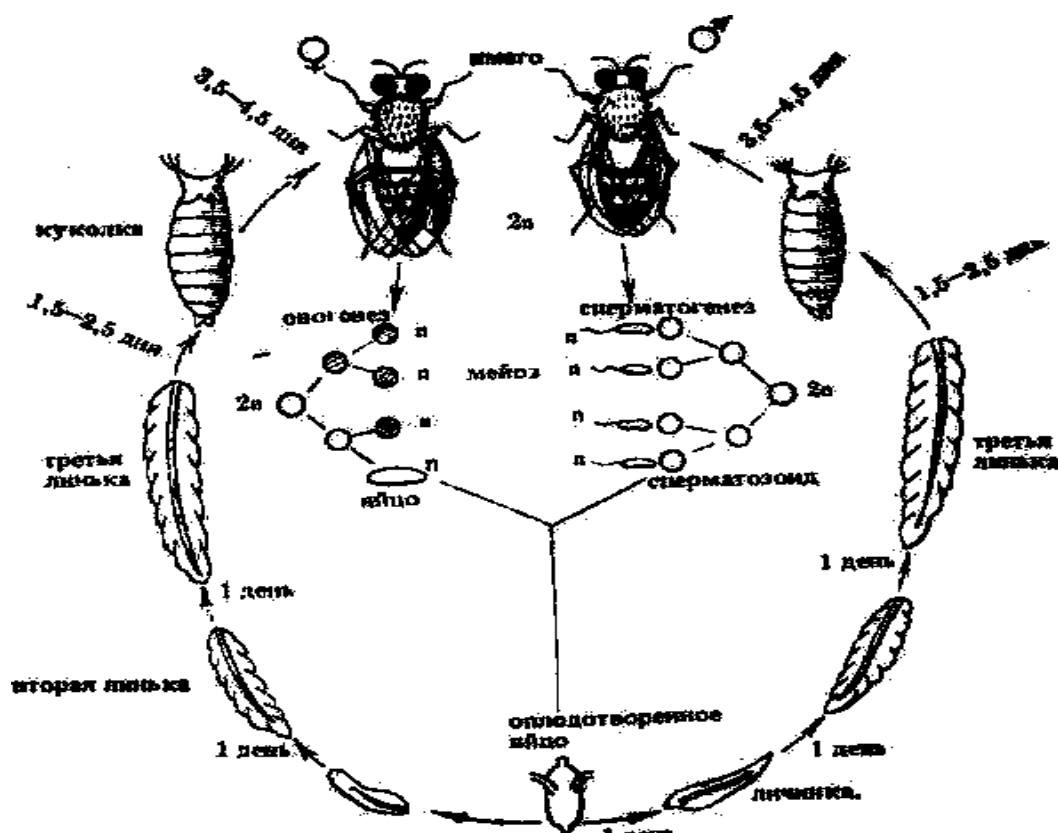


Рис. 1.1.1. Цикл развития *Drosophila melanogaster*

Образование зиготы и эмбриональное развитие происходит внутри яйцевой оболочки. Из яйца появляется личинка, которая питается, растёт и окукливается. Из куколки развивается взрослая особь дрозофилы. Длительность жизненного цикла зависит от температуры, при которой происходит развитие. При оптимальной температуре (25°C) продолжительность стадий развития такова:

- эмбриональное развитие (около 24 – 25 часов);
- личиночный период (около 4 – 5 суток);
- стадия куколки (3 – 4 суток).

Таким образом, при температуре 25°C весь жизненный цикл дрозофилы составляет около 10 дней. Температура 20°C увеличивает период развития дрозофилы до 12–15 дней. При 15°C развитие занимает около 18 дней.

Опыты по скрещиванию проводятся при температуре 24–25°C. Для поддержания линий рекомендуется температура около 20°C. При температуре ниже 20°C жизнеспособность мух понижается, а увеличение выше 25°C ведёт к уменьшению плодовитости.

Продолжительность жизни взрослых особей дрозофилы с момента вылета из куколки в лабораторных условиях составляет 3-4 недели, хотя в специальных условиях опыта дрозофила может жить до 135 дней. Жизнеспособность мутационных форм дрозофилы, как правило, понижена.

1.2. Яйцо и оплодотворение у дрозофилы

Яйцо дрозофилы имеет длину около 0,5 мм. Оно снабжено двумя отростками, помогающими ему держаться на поверхности среды. В момент проникновения сперматозоида яйцо находится на стадии метафазы-1. Мейотические деления яйцеклетки завершаются только в случае проникновения сперматозоидов. Неоплодотворённое яйцо дегенерирует. Яйцо откладывается самкой сразу после проникновения сперматозоида, или оплодотворённое яйцо задерживается в матке самки до конца эмбрионального развития.

1.3. Личинка

Личиночный период состоит из трёх стадий. Первая и вторая стадии заканчиваются линьками, третья - окукливанием. Перед окукливанием личинка достигает длины 4,5 мм. Гонады видны сквозь прозрачные ткани, семенники значительно крупнее яичников. Этим отличием исследователи пользуются для распознавания пола будущих особей на личиночной стадии.

1.4. Куколка

Перед окукливанием личинки выползают из среды на стенки пробирки. На стадии куколки разрушаются старые личиночные органы и возникают новые органы «имаго», отсутствие разрушения наблюдается у гонад и в нервной системе. Органы взрослой мухи закладываются в виде особых участков эмбриональной ткани – имагинальных дисков.

1.5. Имаго

Молодые, только что вышедшие из куколки особи, имеют не расправленные крылья, удлинённое тело и его слабо окрашенные покровы. По этим признакам можно отличить молодых мух от взрослых. Лишь через 8 часов после выхода из куколки, самка дрозофилы способна к оплодотворению. Это время используют для отбора виргинных (не оплодотворённых) самок для постановки скрещиваний.

1.6. Признаки полового диморфизма взрослых особей дрозофилы

При выращивании в сравнимых условиях самки дрозофилы обычно несколько крупнее самцов (рис. 1.6.1.). Конец брюшка у самок имеет заострённую форму, а у самцов - более округлую. Последние брюшные сегменты у самца сильно пигментированы (чёрная точка на конце брюшка).

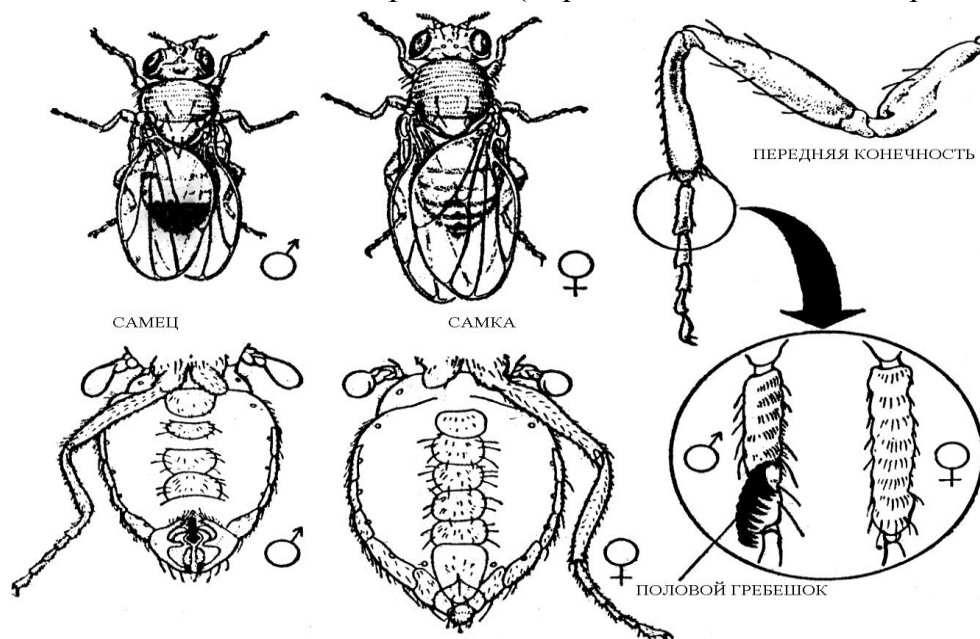


Рис. 1.6.1. Половой диморфизм *Drosophila melanogaster*,

У самцов имеются так называемые *половые гребешки*, которые располагаются в виде ряда крепких хитиновых щетинок на первом членике передних ног. Последний признак можно различить под бинокулярной лупой. В практической работе чаще ориентируются на форму и пигментацию брюшка. Для этого исследуемые особи должны находиться в наркотизированном состоянии на поверхности матового стекла в положении «на спинке».

У взрослого диплоидного самца имеется пара семенников, в которых путем митозов образуются сперматогонии. Когда сперматогоний вступает в мейоз, он является *диплоидным первичным сперматоцитом* (сперматоцит первого порядка). В результате первого деления мейоза из каждого сперматоцита первого порядка образуются два сперматоцита второго порядка. В результате второго деления мейоза образуются четыре гаплоидных сперматиды. Каждая сперматίδα без последующих делений развивается в сперматозоид (спермий). Таким образом, из каждого диплоидного первичного сперматоцита в результате сперматогенеза образуются четыре функционально активных гаплоидных спермия, которые сначала хранятся

у самца дрозофилы, затем попадают в семяприёмные органы самки (*пара сперматек и извитой вентральный семяприёмник*).

Взрослая самка дрозофилы имеет пару яичников, каждый из которых состоит из нескольких десятков яйцевых трубочек (*овариол*). На одном конце трубочек находятся оогонии. В результате четырёх синхронных митотических делений каждый оогоний образует «гроздь», состоящую из 16 клеток, одна из которых вступает в мейоз в виде ооцита первого порядка, остальные служат питающими клетками для созревающего ооцита. По мере роста ооцита, он перемещается по яйцевой трубочке в яйцевод, а затем в матку самки. К тому времени, когда яйцо достигает матки, оно ещё не прошло стадию метафазы первого деления мейоза. Сперма, находящаяся в семяприёмнике самки, поступает в матку, затем один спермий проникает в яйцо, после чего его первое деление мейоза продолжается. Два ядра вторичных ооцитов образуют четыре гаплоидных ядра, три из которых (полярные ядра) дегенерируют, а оставшееся ядро становится гаплоидным ядром яйцеклетки. Таким образом, один первичный ооцит образует по завершении процесса оогенеза одну зрелую гаплоидную яйцеклетку. В теле самки дрозофилы хранятся сотни спермиев, которые постепенно используются. Поэтому одно спаривание может привести к образованию сотни потомков.

1.7. Генетическая детерминация раннего эмбрионального развития дрозофилы

Основой любого детерминированного состояния организма является сбалансированная система ядерно-цитоплазматических отношений. Формирование такой системы показано в исследованиях раннего эмбрионального развития дрозофилы. В середине XX века сформировалось представление о «*морфогенах*» как веществах, индуцирующих образование определенных частей тела. Полагали, что эти вещества диффундируют через ткань и их распределение определяет тот или иной путь развития клетки. Позднее теория морфогенов получила дальнейшее развитие.

По современным представлениям, *морфоген* выделяется из локального источника, и во время последующей диффузии в ткани образуется градиент его концентрации. В каждой группе клеток существует определенный набор и концентрация морфогенов, информация о последующем развитии (*позиционная информация*).

Наиболее изучены градиенты морфогенов, образующиеся в развивающемся яйце дрозофилы. Яйцо дрозофилы созревает в камере - фолликуле. Эта камера содержит созревающее яйцо и 15 питающих клеток, в которых продукты синтезируются и перекачиваются в ооцит. В них активны *гены с материнским эффектом*, т.е. такие гены, которые функционируют в организме матери еще до оплодотворения яйца. Информация с них передается в ооцит. Один из таких генов - *bicoid (bcd)* (И.Ф. Жимулёв, 2002, с.

375). Самки, гомозиготные по мутации *bcd*, откладывают яйца, в которых нормальные эмбрионы не развиваются, даже если эти яйца оплодотворены спермием, содержащим в геноме нормальный аллель гена *bcd*. Весь продукт этого гена, необходимый для развития, синтезируется в теле матери и локализуется в яйце.

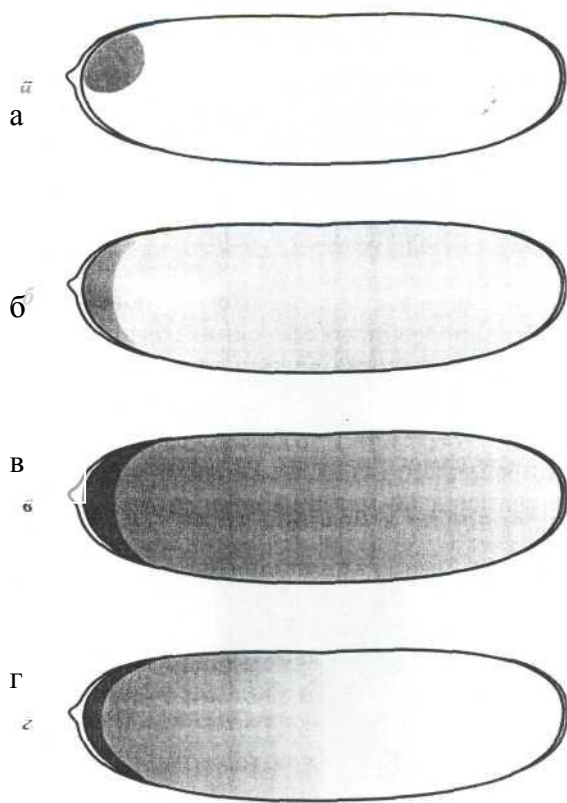


Рис. 1.7.1. Распределение по длине яйца дрозofilы матричной РНК, транскрибируемой с гена *bicoid* (*bcd*) в нормальной линии (а) и у мутантов: *exuperantia* (б), *swallow* (в), *staufer* (г) (Lawrence, 1992. Р. 31). Из кн: Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск. 2002 С. 376.

На рис. 1.7.1. показано распределение продукта гена *bcd* в пределах яйца дрозofilы, который занимает строго определенный участок. Чтобы продукт гена *bcd* занял свой локус, требуется активность других генов. Мутации этих генов приводят к изменению распределения продукта. Так, в нормальном яйце дрозofilы РНК, транскрибируемая с гена *bcd*, располагается локально (рис. 1.7.1, а).

Однако у ряда мутантов распределение РНК в яйце сильно изменено. Так, в результате мутации гена *exuperantia* РНК гена *bcd* более или менее равномерно рассредоточено по всему яйцу с небольшим градиентом от переднего полюса к заднему. У мутантов *swallow* градиент этого морфогена выражен сильнее, т.е. его локализация ближе к нормальному типу: в передней части яйца выявлено большое скопление РНК *bcd*, и некоторое ее количество сосредоточено в остальной цитоплазме (рис. 1.7.1, б, в). Совсем близкое к норме, но все еще ненормальное распределение продукта *bcd*, обнаружено у мутантов *staufer* (рис. 1.7.1, г): у них РНК *bcd* вообще не переходит в заднюю часть эмбриона.

В яйцо поступает РНК, считанная с множества генов. Каждая из этих РНК распределяется по своим зонам в яйце в результате активности других генов. Также высок процент генов, участвующих в формировании яйца.

Белки, кодируемые генами, функционирующими в ходе созревания яйца и транспортируемые туда из питающих клеток, распределяются по оси яйца неравномерно, образуя градиенты, характерные для продуктов каждого гена

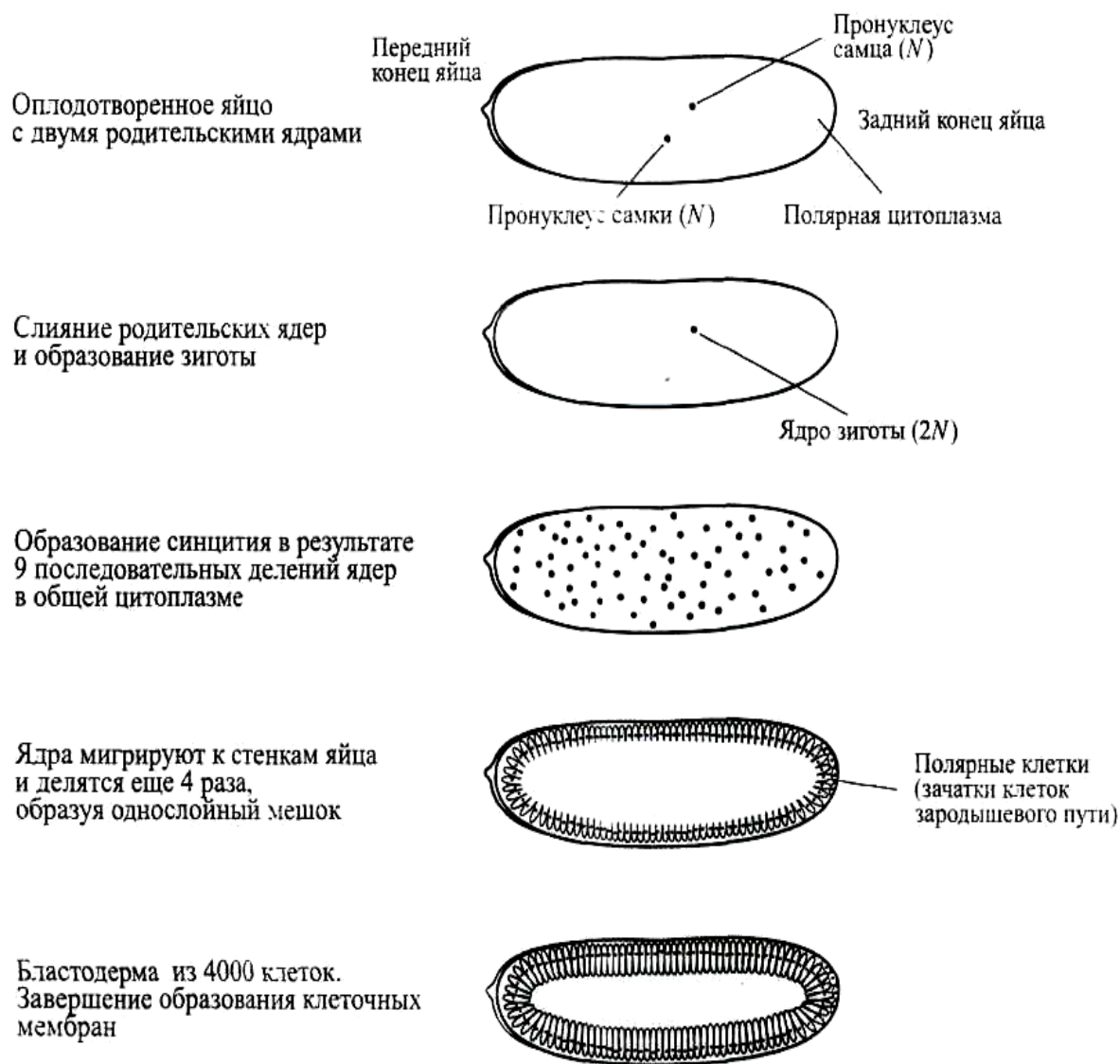


Рис. 1.7.2. Эмбриональное развитие дрозофилы
(Russell, 1998. Р. 570. Из кн: Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика.
Новосибирск. 2002. С. 377.).

При созревании яйца в организме дрозофилы в *яйце* формируются четыре независимые системы:

- переднезадний градиент белков (РНК) гена *bcd*;
- градиент белка гена *nanos*, расположенного в задней части яйца и необходимого для развития брюшка мухи;
- терминирующая система - градиент белка гена *torso*, расположенного на обоих полюсах яйца и необходимого для определения головной и хвостовой частей тела;
- дорзовентральная система, которая зависит от активирования рецепторного белка, кодируемого геном *toll*.

Клетка, возникающая в области локализации морфогена *bcd*, испытывает его влияние, и её развитие будет осуществляться в заданном направле-

нии. Если же клетка расположена в задней части эмбриона, где этого морфогена нет, она будет развиваться иначе. Таким образом, набор определенных белков, накопленных цитоплазмой к данной стадии развития, способен активировать определенный набор генов, благодаря чему поддерживается данное дифференцированное состояние, либо развитие продвигается дальше.

После того как градиенты в яйце созданы, происходит оплодотворение и начинается дробление зиготы (рис. 1.7.2.), в результате чего образуется однослойная бластодерма. Каждая клетка в ней занимает определенное положение по отношению к сформировавшимся градиентам, т. е. обладает определенной *позиционной информацией*. *Морфогены* взаимодействуют с регуляторными участками генов, активирующихся в зиготе (зиготических генов).

Набор определённых белков, накопленных цитоплазмой к определённой стадии развития, способен активировать совокупность генов, вследствие чего поддерживается дифференцированное состояние, и развитие продолжается далее.

Получены доказательства, что эмбриональное развитие дрозофилы определяется созданием переднезадних и спинно-брюшных градиентов в яйце, которые позволяют формироваться парасегментам в клеточной бластодерме, а также сегментам у эмбрионов и взрослых насекомых.

После образования бластодермы и включения зиготических генов начинает формироваться сегментальный план строения тела (рис. 1.7.3). Тело взрослой особи насекомых (имаго) состоит из ясно выраженных сегментов. В бластодерме сегментация выявляется лишь по продуктам определенных генов, сегменты четко не выражены и носят название парасегментов. На более поздних стадиях развития сегменты хорошо обособляются друг от друга и легко обнаруживаются. Эмбриональные сегменты дают начало сегментам взрослой мухи.

Сегментация эмбрионов и имаго полностью идентичны. У дрозофилы личинки и имаго имеют ярко выраженные сегменты: один головной, три грудных и восемь брюшных, каждый сегмент имаго содержит уникальный набор дифференцированных морфологических структур. Например, мезоторакальный сегмент несет пару крыльев и пару ног, метаторакальный - пару ног и пару гальтеров булавовидных образований, регуляторов равновесия в полёте.

В 1995 г. Э. Льюису (E.B. Lewis), К. Нюссляйн-Волхард (C. Niisslein-Volhard) и Э. Вишаусу (E.W. Wieschaus) была присуждена Нобелевская премия за открытие генетического контроля раннего эмбрионального развития.

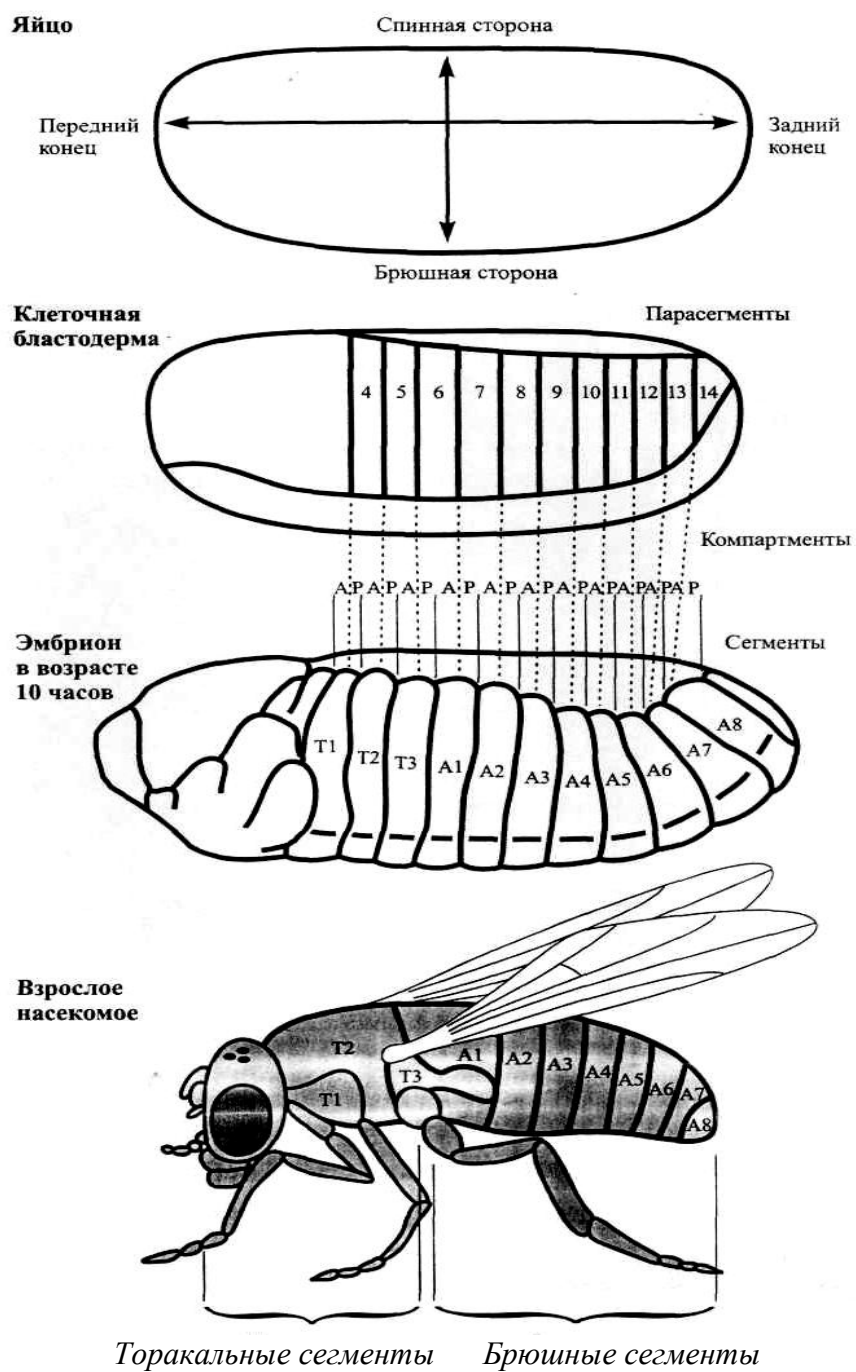


Рис 1.7.3. Расположение сегментов на разных этапах развития
Drosophila melanogaster

(Russell, 1998. P. 571. Из кн.: Жимулёв(а) И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск. 2002. С.378).

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ.

1. *Какими преимуществами обладает дрозофила для цитологического и генетического изучения?*
2. *В чём заключаются основные различия между сперматогенезом и овогенезом у дрозофилы?*
3. *Каков сегментальный план строения тела личинки и имаго *Drosophila melanogaster*?*
4. *Что такое «морфогены»?*
5. *В чём сущность современных исследований генетической детерминации раннего эмбрионального развития дрозофилы?*
6. *Теряет ли самка дрозофилы свой собственный генетический материал, когда передаёт его многочисленному потомству?*

2. ПОДДЕРЖАНИЕ ЛИНИЙ ДРОЗОФИЛЫ

Для поддержания линии необходимо получать ряд последовательных поколений, сохраняя их *гомозиготность*. Существует опасность потерять линию вследствие генетического засорения культуры или появления плесени на поверхности питательной среды. Засорения можно избежать путём постоянного контроля и оценки чистоты линии при каждом пассаже мух, используемых для дальнейшего размножения. Образование плесени можно предупредить путём соблюдения правил асептики и антисептики в процессе приготовления питательной среды. Если, несмотря на это плесень появилась, от неё можно избавиться путём ряда пересева культуры дрозофилы на свежую питательную среду.

Просмотр мух производится тогда, когда они находятся в наркотизированном состоянии. Наркотизация производится в эфиризаторе (морилке). Наркотизированные мухи могут оставаться в состоянии наркоза около 5 минут.

Наркотизация мух производится следующим образом:

Пробирка с находящимся в ней мухами осторожно встряхивается (дном о ладонь) до тех пор, пока все мухи не окажутся на дне пробирки. В этот момент открывается пробка эфиризатора и пробирка с мухами надвигается на него. Затем пробирка и эфиризатор переворачиваются так, что эфиризатор находится внизу, и постукиванием (по его дну) мухи сгоняются на дно. В этот момент пробка эфиризатора закрывается, и *экспериментатор* ждёт, пока не перестанут двигаться все особи в пробирке. Тогда эфиризатор открывают и высыпают всех мух на матовое стекло для анализа. Если мухи начнут двигаться раньше, чем была произведена их оценка и анализ, их закрывают часовым стеклом, под которое подводится небольшое количество ваты, смоченной эфиром. Мух можно пересыпать из пробирки в пробирку без наркотизации.

В лабораторных условиях употребляются пробирки высотой 7,5 см и 3 см диаметром. В такую пробирку наливается среда, слой которой составляет 1,0–1,5 см. На это количество среды в пробирку помещают не более 5 самок и такое же количество самцов. При большем количестве самок возрастает опасность перенаселения, в результате которого плодовитость мух снижается. Если линия обладает низкой жизнеспособностью и плодовитостью, следует увеличить количество самцов в расчёте на одну самку. Во избежание возможности потери линии, каждую необходимо вести в нескольких пробирках (не менее 5 – 20).

Одна самка может отложить до 200 яиц, но, в течение первых 1-2 суток после выхода из куколки, самки откладывают очень мало яиц. Кладка яиц лучше всего происходит на среду, на которой достаточно хорошо про-

росли дрожжи; оптимальной считается среда не более 1-2 дней приготовления. Использование более «старой» среды не целесообразно.

При проведении опытов по скрещиванию самцы находятся вместе с самками около 4–5 суток. После этого, во избежание перенаселения, родительское поколение удаляется из пробирок.

2.1. Питательная среда для дрозофилы

Существуют различные рецепты питательных сред для дрозофилы (Н.Н. Медведев, 1966 и другие), основными компонентами которых являются сахар, дрожжи, манная крупа, вода и агар-агар.

В таблице 2.1.1 приводится один из наиболее распространённых и испытанных в условиях лабораторного практикума различных университетов рецептов питательной среды для дрозофилы в расчёте на любое количество пробирок. В состав питательной среды могут добавляться другие компоненты: изюм, бананы.

Таблица 2.1.1

Состав питательной среды для дрозофилы
(в расчёте на определённое количество пробирок)

№	Количество пробирок, шт.	Вода, мл	Агар-агар, г.	Прессованные дрожжи, г.	Сахарный песок, г.	Манная крупа, г.
1.	50	350	4,5	40	13	13
2.	100	700	9,0	75	25	25
3.	150	1050	15,0	115	40	40
4.	200	1400	18,0	150	50	50
5.	300	2100	27,0	225	75	75
6.	400	2800	3,0	300	100	100
7.	500	3500	45,0	375	125	125

Количество агар-агара может быть уменьшено или увеличено на 1–2 г на 100 пробирок в зависимости от его качества. Критерий: среда не должна разливаться и вытекать при работе с мухами.

2.2. Процесс подготовки среды для дрозофилы

Все составные части среды следует взвесить на технических весах. К навеске агар-агара добавить соответствующее количество холодной воды, периодически помешивая, довести до кипения, в результате чего агар-агар постепенно растворится. Варить среду рекомендуется в алюминиевой посуде, поскольку в эмалированной посуде она, как правило, пригорает.

В кипящий раствор агар-агара добавляют измельчённые дрожжи, доводят до кипения при постоянном помешивании и кипятят на слабом огне 40 минут с момента закипания (в начале кипения дрожжи сильно вспени-

ваются). Во время кипения в открытой посуде вода испаряется и, по мере выкипания, доливается горячая вода до первоначального объёма.

По истечении 40-минутного кипения добавляют сахарный песок и манную крупу при постоянном помешивании, избегая образования сгустков манной крупы. Снова доводят до кипения и кипятят 15 минут.

После окончания варки среду охлаждают до 60-70°C и разливают в специальные «дрозофильные» пробирки. После снижения температуры среды её поверхность в пробирках засеивается дрожжами. Для нанесения на поверхность питательной среды используются только свежие дрожжи (желательно чистых культур), которые растворяются в дистиллированной воде и наносятся тонким слоем кисточкой на среду в пробирке так, чтобы вся поверхность была равномерно смазана.

Пробирки с остывшей средой закрываются стерильными ватными пробками. Пробки, бывшие в употреблении, стерилизуются в автоклаве (при давлении 2,5 атм. в течение 20 минут) и используются вновь. Среда пригодна для использования в течение 2–3-х дней при условии хранения её в холодильнике. Дрожжи хранятся в холодильнике при температуре от 0 до 4°C.

При отсутствии специальных пробирок можно использовать обычные химические пробирки, которые собирают пачками для разлива среды и дальнейшего использования. Вместо прессованных дрожжей для варки среды можно пользоваться сухими дрожжами, произведя пересчёт на прессованные дрожжи, содержащие 75% воды.

2.3. Обработка пробирок

Отработанные пробирки освобождают от ватных пробок, помещают в посуду с водой и небольшим количеством каустической соды (около 20-25 г на ведро воды) и нагревают до кипения. Таким способом достигается растворение сухой среды. После остывания воды можно мыть пробирки проточной водой.

Высушенные пробирки стерилизуют в автоклаве или в жарочном шкафу при температуре 200°C. Стерилизованные пробирки (до и после разлива среды) должны быть закрыты стерильной марлей. После остывания среды её поверхность смазывают дрожжами. Пробирки закрывают стерильными ватными пробками и помещают в холодильник до последующего использования в опытах или для пересадки мух.

2.4. Оборудование рабочего места для работы с дрозофилой

Для работы с дрозофилой необходимо следующее оборудование.

- 1) Капельницы с притёртыми пипетками для эфира.
- 2) Настольные лампы.

- 3) Морилки (эфиризаторы). *Эфиризатор* может быть любой степени сложности. Например, толстостенная плоскодонная пробирка для среды, закрытая корковой пробкой. На пробке делается углубление для ваты, на которую при наркотизации мух наносится эфир.
- 4) Матовые стекла для разбора мух размером 5×10 см.
- 5) Кисточки или куриные перья.
- 6) Бинокулярный микроскоп (МБС-9) с увеличением 10×- и 20× и ручная лупа с увеличением 2×, 4×.
- 7) Часовые стёкла.
- 8) Термостат.
- 9) Технические весы.
- 10) Мерная стеклянная посуда.
- 11) Электрическая плитка.
- 12) Сушильный шкаф (200°C).
- 13) Автоклав.
- 14) Вата, марля.
- 15) Лотки для размещения пробирок.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

- 1) *Как можно проверить, является ли линия дрозофилы генетически чистой?*
- 2) *Каким образом можно увеличить или уменьшить период развития дрозофилы?*
- 3) *Каковы правила отбора виргинных самок для скрещивания?*

3. ПОСТАНОВКА СКРЕЩИВАНИЙ В СИСТЕМЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

3.1. Генетический анализ

«Генетическим анализом мы называем систему опытов, наблюдений и вычислений, имеющих целью разложение свойств (признаков) организма на отдельные наследственные элементы, «отдельные признаки», и изучение свойств соответствующих им генов», - А.С. Серебровский, 1970 г.

С помощью генетического анализа исследуется качественный и количественный состав генотипа, проводится анализ его структуры и функционирования (М.Е. Лобашев, 1967). Предметом непосредственного исследования в генетическом анализе является фенотип организма, его отдельные признаки.

Методы генетического анализа в настоящее время разнообразны, но главным образом это система скрещиваний с последующим анализом наследования генов (и признаков) в потомстве.

3.1.1. Основные этапы генетического анализа

- Выяснение вопроса, наследуется ли признак, наличие контрастных (альтернативных) форм.
- Установление числа генов, контролирующих развитие данного признака.
- Выяснение наличия (или отсутствия) взаимодействия между этими генами.
- Определение группы сцепления (хромосомы).
- Картирование генов в хромосоме.
- Исследование характеристик генов.

Картирование генов начинается с установления группы сцепления, а затем проводятся эксперименты по определению локуса гена в определенном участке хромосомы. В настоящее время в понятие генетического анализа входит также клонирование гена, определение последовательности нуклеотидов ДНК, выяснение структуры гена и времени его экспрессии в онтогенезе.

У дрозофилы генетический анализ включает следующие этапы:

- получение мутаций, спонтанных или индуцированных;
- тестирование мутаций на аллелизм;
- картирование гена в группе сцепления;
- построение кроссоверных карт генов;
- картирование генов с помощью хромосомных перестроек;

- картирование генов с помощью гибридизации *in situ*.

Однако не всегда обязательно проведение всех перечисленных действий. Если имеется ДНК данного гена, то для его хромосомной локализации можно сразу провести гибридизацию *in situ*, но чаще всего для получения ДНК гена необходимо провести все этапы генетического анализа.

3.2. Хромосомы дрозофилы.

Использование политенных хромосом в генетическом анализе

В соматических клетках самца и самки дрозофилы содержится по 8 хромосом ($2n = 8$): три пары *аутосом* и одна пара половых хромосом (рис 3.2.1). Генетическая конституция самцов дрозофилы: $2A+XY$, самок: $2A+XX$. Генетическая детерминация пола у дрозофилы происходит при мужской гетерогаметности ($\text{♀} X X - \text{♂} XY$).

Пары гомологичных хромосом (соответствующие группам сцепления генов) обозначены на рис. 3.2.1: первая пара (1) – половые хромосомы, 2-я пара – субметацентрические хромосомы с субмедианной центромерой, 3-я пара – субметацентрические хромосомы, 4-я пара – малые акроцентрические хромосомы.

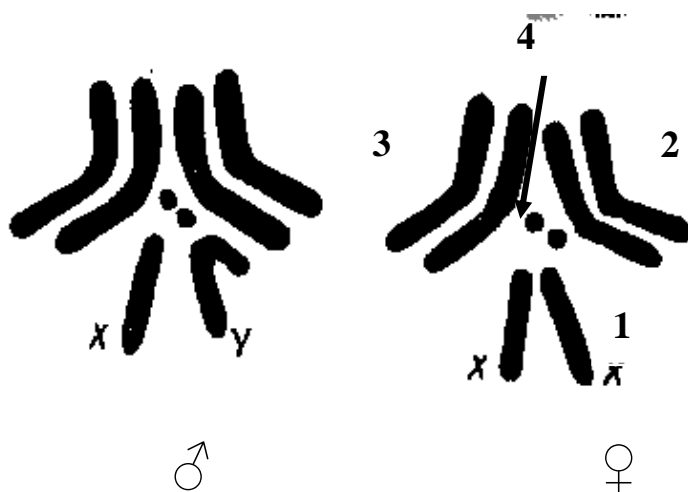


Рис 3.2.1. Хромосомы самца (слева) и самки (справа) дрозофилы в диплоидном наборе

Примечание:

X и Y – половые хромосомы; 1, 2, 3, 4 – порядковый номер группы сцепления генов.

Определённые участки Y-хромосомы гомологичны участкам X-хромосомы, поэтому они конъюгируют и равномерно распределяются в мейозе.

Политенные хромосомы дрозофилы. В клетках слюнных желез личинок дрозофилы имеются политенные (гигантские) хромосомы, которые на протяжении многих десятилетий являются объектом, использование которого обусловило многие фундаментальные открытия. В начале 30-х г.

XX в. исследования на политенных хромосомах позволили подтвердить теорию хромосомной наследственности.



Рис. 3.2.2. Гетерозиготная делеция в политенных хромосомах дрозофилы. (T. Painter, 1934).

Исследования Дж. Паттерсона (1932) и Мак-Кензен (1934, 1935) показали, что небольшие *делеции* (рис. 3.2.2) можно использовать для точного картирования генов. С применением этого метода в 30-х гг. XX века гены были картированы с большой точностью, вплоть до определённого диска и даже частей диска политенных хромосом. Сопоставление порядка локализации генов на генетической карте и в политенных хромосомах обнаружило их полную идентичность. К настоящему времени сотни генов дрозофилы картированы на картах политенных хромосом с помощью метода делеции.



Рис. 3.2.3. Первый рисунок гетерозиготной инверсии в хромосоме личинки *Drosophila melanogaster*. (T. Painter, 1934)

На политенных хромосомах идентифицируются гетерозиготные инверсии (рис. 3.2.3). В 1936 г. Н.П. Дубинин, Н.Н. Соколов и Г.Г. Тиняков и другие авторы начали использовать политенные хромосомы в исследованиях инверсионного полиморфизма и структуры популяций, которые проводятся разными лабораториями уже много лет.

Метод цитогенетического картирования в настоящее время дополняется методом гибридизации *in situ*, который позволяет локализовать гены с точностью до нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов.

Следующий шаг в понимании организации и функционирования хромосом был сделан с развитием методов микроклонирования. Это дало возможность экспериментатору выбирать район хромосомы, вырезать его с помощью микроманипулятора и создавать библиотеку микроклонов из данного района политенной хромосомы. С помощью этого метода клонирована

существенная часть X-хромосомы и левого плеча второй хромосомы, были созданы библиотеки клонов из прицентромерного гетерохроматина.

С использованием политенных хромосом было установлено, что гормоны влияют на развитие организма через активирование генов и изменение активности генов под действием гормонов носит каскадный характер. В результате исследований на политенных хромосомах было открыто явление ответа клеток на стресс (*синдром теплового шока*).

3.3. Методика постановки скрещиваний и используемые линии дрозофилы

Для скрещивания целесообразно использовать *виргинных* (неоплодотворённых) самок, так как жизнеспособная сперма от предыдущей копуляции сохраняется в половых путях самки дрозофилы в течение нескольких суток. Перед постановкой скрещивания необходимо заранее отобрать *виргинных* самок в одной из скрещиваемых линий. С этой целью в линии, где необходимо получить *виргинных* самок, все мухи удаляются из пробирки. Самки дрозофилы, вылупившиеся из яиц в течение 6-8 часов, не приобретают половой зрелости, а самцы этого возраста не способны к оплодотворению. Все самки, отобранные в этот период, являются *виргинными*. В течение первых 2-3 часов после вылета из куколки особи дрозофилы имеют нерасправленные крылья и удлиненное светлое тело. Эти признаки также учитываются при отборе виргинных самок. Самку отличают от самца несколько большие размеры тела и заостренный кончик брюшка. У самцов конец брюшка пигментирован. До постановки скрещивания самки содержатся отдельно от самцов.

Виргинных самок соответствующей линии (3-5 шт.) помещают в одну пробирку с самцами другой линии. Эти мухи составляют родительское поколение. Родительские особи остаются в пробирках в течение 4-5 суток, после чего их удаляют из емкостей, а из отложенных яиц развивается новое поколение скрещивания. Подсчёт результатов скрещивания производится в течение 5-7 дней. Опыты ставятся в термостате при температуре 24-25°C.

3.3.1. Моногибридное скрещивание

Для моногибридного скрещивания используются линии, маркированные *аутосомным геном*, которые скрещиваются (*реципрочно*) с особями линии дикого типа. Для скрещивания отбираются виргинные самки. Параллельно ставят анализирующее скрещивание. При скрещивании гибридов F_1 между собой виргинных самок не отбирают, при анализирующем скрещивании подсчёт его результатов обязательно производится в F_2 и F_3 .

Рекомендуемые линии:

- *cinnabar* – *cn* – (вторая хромосома) – ярко красный цвет глаз;
- *brown* – *bw* – (вторая хромосома) – коричневый цвет глаз;
- *vestigial* – *vg* – (вторая хромосома) – редуцированные крылья;
- *ebony* – *e* – (третья хромосома) – чёрный цвет тела;
- *curved* – *c* – (третья хромосома) – искривлённые крылья;
- + - (*cn+*, *bw+*, *vg+* и т.д.) – линия «дикого типа».

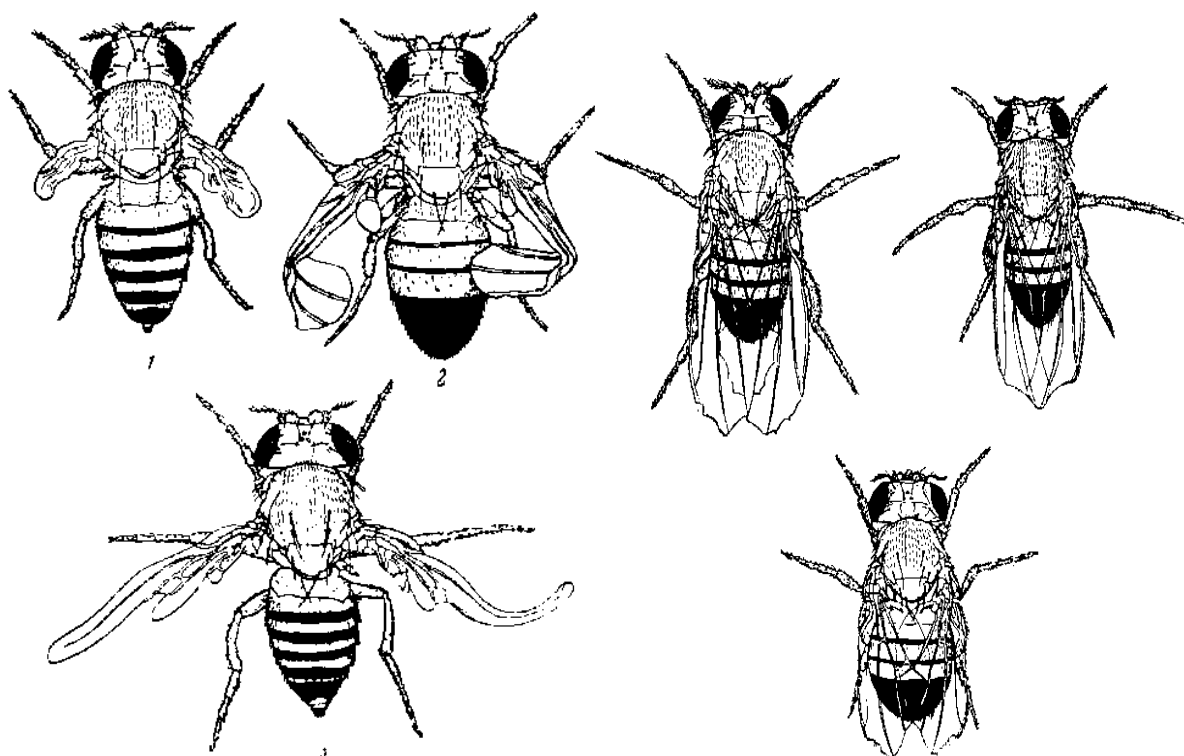


Рис 3.3.1.1. Слева: аллеломорфные мутанты серии *vestigial*, *vg*.
Справа: аллеломорфные мутанты дрозофилы серии *cut*, *ct*,
отличающиеся по степени зазубренности крыльев.

Пример анализа наследования признаков в F_1 и F_2 при моногибридном скрещивании.

У дрозофилы ген нормального строения крыльев (vg^+) доминирует над геном редуцированных крыльев (vg , *vestigial*)

$P: \text{♀ } vg \text{ } vg \times \text{♂ } vg^+ \text{ } vg^+$ (скрещивания ставятся реципрокно)
(самки виргинные)

Гаметы ♀ vg ♂ vg^+

$F_1 \text{ } vg^+ \text{ } vg$ - нормальные крылья.

Гибридных особей F_1 (♀ и ♂) пересаживают на свежую среду для скрещивания между собой и получения F_2 .

$$\text{♀ } vg^+ vg \times \text{♂ } vg^+ vg$$

Анализ результатов расщепления проводится в F_2 .

Расщепление в F_2 : $(1/4 vg^+ vg^+) + (2/4 vg^+ vg) + (1/4 vg vg)$.

Расщепление по фенотипу среди потомков F_2 :

3/4 потомков (♀ и ♂) с нормальными крыльями +
1/4 часть потомков с редуцированными крыльями.

Результаты качественного и количественного анализов наследования гена редуцированных крыльев у дрозофилы

Анализ гибридов первого поколения F_1 . Всех особей первого поколения (в наркотизированном состоянии) следует высыпать на поверхность матового стекла. Необходимо убедиться, что все мухи имеют нормальные крылья.

Таблица 3.3.1.1

Протокол № 1 опыта

Анализ гибридов первого поколения F_1 . (пример)

№ пробирок	Количество особей		Всего
	Нормальные крылья	Редуцированные крылья	
1	38	нет	38
2	42	нет	42
n	131	нет	131
Всего	211	нет	211

Результаты анализа занести в протокол № 1 опыта. В каждой пробирке следует проанализировать расщепление по полу.

Параллельно необходимо поставить анализирующие скрещивания:

♀ $vg^+ vg \times \text{♂ } vg vg$ для учёта расщепления в потомстве бекроссов:

F_b : расщепление: 1:1.

$vg^+ vg$ особи с нормальными крыльями (вероятность 50%) +
 $vg vg$ (особи с редуцированными крыльями (вероятность 50%).

Анализ расщепления во втором поколении

Каждый студент проводит индивидуальный анализ расщепления в F_2 в пробирках заложенного им опыта. Затем получают суммарные данные по

всей группе. В ходе анализа экспериментатор должен убедиться, что в пробирках среди мух с нормальными крыльями появились особи с редуцированными крыльями. Необходимо учесть количество тех и других. Все результаты заносятся в протокол № 2 опыта.

Таблица 3.3.1.2

Протокол № 2 опыта

**Анализ количественного расщепления по форме крыльев
во втором поколении моногибридного скрещивания дрозофилы (пример)**

№ опыта	Количество особей		Всего
	Нормальные крылья (p_1)	Редуцированные крылья (p_2)	
1	229	91	320
2	291	82	373
3	284	104	388
б			
n	405	119	524
Суммарные эмпирические данные по классам расщепления (p)	1209	396	1605
Теоретически ожидаемые данные расщепления (q), исходя из формулы 3:1	1204	401	1605
Отклонение (d) = $p - q$	+ 5	- 5	
d^2	25	25	
d^2 / q	0,02	0,08	
$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{q}$	$\chi^2 = 0,02 + 0,06 = 0,08$; $\chi^2_{st} = \{3,8-6,6-10,8\}$ (приложение). Число степеней свободы $\gamma = 1$ (Количество классов расщепления $n - 1 = 2 - 1 = 1$) $\chi^2 = 0,08 < \chi^2_{st}$.		

Вывод: Отклонение фактического расщепления от теоретически ожидаемого имеет случайный характер. Значение эмпирического критерия χ^2 не достигает стандартных значений. Фактические результаты соответствуют теоретически ожидаемому расщеплению (3:1).

3.3.2. Дигибридное скрещивание

При постановке дигибридного скрещивания используются две линии дрозофилы, маркированные аутосомными генами из разных хромосом (2 и 3; 3 и 4; 2 и 4), например:

- cn (*cinnabar*) \times e (*ebony*) - реципрокно
2-я хромосома 3-я хромосома;
- vg (*vestigial*) \times st (*scarlet*) - реципрокно
2-я хромосома 3-я хромосома;

- vg (*vestigial*) × e (*ebony*) - реципрокно
2-я хромосома 3-я хромосома.

Для скрещивания используются *виргинные* самки, которых отбирают заранее и содержат в пробирках со свежей средой отдельно от самцов.

Гибридных особей F_1 (♀ и ♂) пересаживают в пробирки со свежей средой для скрещивания между собой. Подсчёт и анализ результатов расщепления проводится в F_2 .

Для проведения скрещивания также может использоваться линия *cn e*, гомозиготная по двум рецессивным генам, находящимся во второй и третьей хромосоме, и линия дикого типа:

$$\begin{aligned} & \text{♀ } cn\ e \times \text{♂ } \text{дикий тип } (++) \\ & \text{♀ } \text{дикий тип } (++) \times \text{♂ } cn\ e. \end{aligned}$$

Пример анализа наследования признаков в F_1 F_2 :

$$\begin{aligned} & vg\ (vestigial) \times e\ (ebony) \\ & \text{2-я хромосома} \quad \text{3-я хромосома} \end{aligned}$$

Черная окраска тела (e) у дрозофилы наследуется как рецессивный признак; серая окраска тела - доминантный ($e+$), ген нормального строения крыльев ($vg+$) доминирует над геном редуцированных крыльев (vg).

$$P.... \quad \text{♀ } e+ \ e+ \ vg \ vg \times \text{♂ } e \ e \ vg+ \ vg+$$

$$\text{Гаметы: } \text{♀ } e+ \ vg \quad \text{♂ } e \ vg+$$

F_1 (серое тело, нормальные крылья)

$$\text{♀ } e+ \ e \ vg+ \ vg \times \text{♂ } e+ \ e \ vg+ \ vg$$

Анализ расщепления в F_2 .

Гаметы ♀ и ♂	$e+ \ vg+$	$e+ \ vg$	$e \ vg+$	$e \ vg$
$e+ \ vg+$	$e+e \ vg+vg+$	$e+e \ vg+vg$	$e+e \ vg \ vg+$	$e+e \ vg \ vg$
$e+ \ vg$	$e+e \ vg+vg$	$e+e \ vgvg$	$e+e \ vg \ vg$	$e+e \ vgvg$
$e \ vg+$	$e+e \ vg+vg+$	$e+e \ vg+vg$	$ee \ vg+vg+$	$ee \ vg+vg$
$e \ vg$	$e+e \ vg+vg$	$e+e \ vg \ vg$	$ee \ vg+vg$	$ee \ vgvg$

Фенотипы потомков F_2 :

$$[9/16 \ e+ \ - \ vg^+ \ -]:[3/16 \ e+ \ - \ vg \ vg]:[3/16 \ e \ e \ vg+ \ -]:[1/16 \ e \ e \ vg \ vg]:$$

серое тело
нормальные
крылья

серое тело
редуцированные
крылья

черное тело
нормальные
крылья

черное тело
редуцированные
крылья.

Таблица 3.3.2.1

Количественный анализ (Пример)
наследования двух пар признаков: окраска тела (серая и чёрная) и форма крыльев (нормальные крылья и редуцированные)

№ пробирки или опыта	Количество особей, штук				
	Серое тело, нормальные крылья	Серое тело, редуцированные крылья	Чёрное тело, нормальные крылья	Чёрное тело, редуцированные крылья	Всего
1	44	20	21	5	
2	31	11	14	6	
3	34	10	18	3	
n	849	248	267	81	
Суммарные эмпирические данные по классам расщепления (p)	958	289	320	95	1662
Теоретически ожидаемые классы расщепления (q): 9:3:3:1	934	312	312	104	1662
Отклонение $d = (q - p)$	+ 24	- 23	+ 8	- 9	
d^2	576	529	64	81	
d^2/q	0,67	1,70	0,20	0,78	
$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{q}$	$\chi^2 = 0,67 + 1,70 + 0,20 + 0,78 = 3,35$; число степеней свободы $\gamma = 3$ (Количество классов расщепления $n - 1 = 4 - 1 = 3$). $\chi^2_{st} \{ 7,8 - 11,3 - 16,3 \}$ приложение, табл. 2. $\chi^2 = 3,35 < \chi^2_{st}$				

Выводы:

Отклонение фактического расщепления от теоретически ожидаемого носит случайный характер. Значение эмпирического критерия χ^2 не достигает стандартных значений.

Эмпирическое расщепление по фенотипу соответствует теоретически ожидаемому: 9:3:3:1.

3.3.3. Наследование при взаимодействии генов

Генотип представляет собой сложную систему генов. При этом гены отдельных аллельных пар вступают в различные типы взаимодействия, определяя новое качество, не характерное для результата действия каждой отдельной пары генов. В результате взаимодействия между различными парами неаллельных генов, «типичное» дигибридное расщепление изменя-

ется, и наблюдаются иные соотношения фенотипов в потомстве: 9:7, 9:3:4, 12:3:1, 13:3, 15:1.

Для изучения наследования признаков, детерминируемых при взаимодействии неаллельных генов, особи линии, маркированной геном второй хромосомы – *bw* (*brown*), скрещиваются *реципрокно* с особями линии *st* (*scarlet*) третьей хромосомы.

bw – коричневый цвет глаз,

st – ярко-красный цвет глаз.

Скрестить реципрокно линии:

bw st+ *bw+ st*

bw st+ *u* *bw+ st*

Примечание: используются *виргинные* самки.

Взаимодействуя, доминантные гены *bw+ u st+* в первом поколении определяют красную окраску глаз дикого типа ($\tilde{\text{♀}}$ и ♂ F₁):

bw st+

bw+ st

Методика постановки скрещиваний такая же. В F₂ при анализе расщепления выявляется 4 фенотипа особей:

- 9/16 - *bw+ - st+* - особи с красными глазами дикого типа;
- 3/16 - *bw+ -st st* особи с ярко-красными глазами типа *st*;
- 3/16 - *bw - st+ st* особи с коричневыми глазами типа *bw*;
- 1/16 - *bw bw st st* особи с белыми глазами.



Варьирование проявления мутации *eyeless* у дрозофилы:

а — нормальный глаз; *б–д* — различная степень редукции глаза у мутантов [Гершензон, 1983. С. 411]

Один и тот же ген может *мутировать* во множество состояний, до нескольких десятков и более (серия *множественных аллелей*). Так, проявление гена *eyeless*, *ey*, локализованного в IV хромосоме дрозофилы (локус 0,2), варьирует от частичной ре-

дукции глаз до полной (безглазый). Гетерозиготное состояние по двум мутантным аллелям одного локуса имеет название *компаунд*. Члены серии множественных аллелей не только по-разному определяют развитие признаков, но и вступают в различные доминантно-рецессивные отношения друг с другом.

3.3.4. Наследование признаков, сцепленных с полом

Признаки, детерминированные генами, которые локализованы в половых хромосомах, неодинаково передаются потомкам мужского и женского пола. Причина заключается в том, что X и Y-хромосомы не вполне гомологичны. В X-хромосоме локализовано значительно больше генов, поэтому большинство генов X-хромосомы не имеют парных аллелей в Y-хромосоме. Такие гены находятся в «гемизиготном» состоянии (*гем* - половина). При сцеплении генов с X-хромосомой наблюдается «крисс-кросс» - наследование «крест-накрест», т. е. передача генов от одного пола к другому.

У дрозофилы (а также млекопитающих, двудомных растений и многих других организмов) мужская гетерогаметность: ♀ XX - ♂ XY. У других (птицы, бабочки, некоторые рыбы) гетерогаметным является женский пол. Если признак сцеплен с полом, то при проведении скрещиваний наблюдается следующее.

- Результаты реципрокных скрещиваний не совпадают.
- Если рецессивный, сцепленный с полом признак «входит» в скрещивание по мужской линии, то в первом поколении он не проявляется, а во втором поколении передается лишь внукам мужского пола.
- Если рецессивный, сцепленный с полом признак «входит» в скрещивание по женской линии, то в первом поколении он передается сыновьям, а доминантный признак - от отцов дочерям (*крисс-кросс* - наследование). Во втором поколении рецессивный признак проявляется у сыновей и дочерей (вероятность 25%).
- Если сцепленный с полом ген летален, то все рецессивные гомозиготы и «гемизиготы» погибают.
- Если признак присутствует у отца, а в первом поколении проявляется только у дочерей, он также сцеплен с X-хромосомой, но определяется доминантным геном.
- Если признак передается только по мужской линии, он сцеплен с Y-хромосомой.

Наследование генов красной (w⁺) и белой окраски глаз (w, white) у дрозофилы

У дрозофилы рецессивный ген белых глаз (w, *white*) и его доминантный аллель (w⁺, *красные глаза*), определяющий красный цвет глаз, локализованы в X-хромосоме. В Y-хромосоме отсутствует аллель этого гена (*гемизиготное состояние*).

Схемы реципрочных скрещиваний

Первое направление скрещивания:

Рецессивный, сцепленный с полом признак (белые глаза) «входит в скрещивание» по мужской линии.

$$\begin{array}{l}
 P \quad \text{♀ } w^+ w^+ \times \text{♂ } w Y \\
 \text{Красные глаза} \quad \text{Белые глаза} \\
 \downarrow \\
 F_1 \quad \text{♀ } w^+ w \times \text{♂ } w^+ Y \\
 \text{Все ♀ и ♂ красноглазые} \\
 \downarrow \\
 F_2 \quad \text{♀ } w^+ w^+; \quad \text{♀ } w^+ w; \quad \text{♂ } w^+ Y; \quad \text{♂ } w Y. \\
 \text{Красные глаза} \quad \text{Красные} \quad \text{глаза} \quad \text{Белые глаза}
 \end{array}$$

Расщепление по полу 1:1

Расщепление по фенотипу в F_2 - 3:1, однако рецессивный признак проявляется только у особей мужского пола.

В первом поколении (F_1) в данном скрещивании все самцы и самки имеют красные глаза. У самок ($w^+ w$) в гетерозиготном состоянии в X-хромосоме присутствует ген белой окраски глаз.

Во втором поколении, F_2 :

Рецессивный признак «белые глаза» передаётся только самцам, вероятность 25%

Общее расщепление по полу и фенотипу в F_2 : 2:1:1:

2/4 потомков – красноглазые самки;

1/4 часть - красноглазые самцы;

1/4 часть белоглазые самцы.

В целом, расщепление по признаку «цвет глаз» получается 3:1, но все самки имеют один фенотип, а самцы два фенотипа (1:1).

Второе направление скрещивания:

Рецессивный, сцепленный с полом признак «входит в скрещивание» по женской линии.

В первом поколении наблюдается «criss-cross» - наследование (крест-накрест), расщепление по полу и фенотипу совпадает: (1:1). При этом белоглазыми являются только самцы, самки все красноглазые.

$$\begin{array}{l}
 P \quad \text{♀ } w w \times \text{♂ } w^+ Y \\
 \text{Белые глаза} \quad \text{Красные глаза} \\
 F_1 \quad \text{♀ } w^+ w \times \text{♂ } w Y \\
 \text{Красные глаза} \quad \text{Белые глаза} \\
 \downarrow \\
 F_2 \quad \text{♀ } w^+ w; \quad \text{♀ } w w \quad \text{♂ } w^+ Y; \quad \text{♂ } w Y \\
 \text{Красные глаза} \quad \text{Белые глаза} \quad \text{Красные глаза} \quad \text{Белые глаза}
 \end{array}$$

Расщепление по полу и фенотипу в F_2 : 1:1:1:1

Во втором поколении:

расщепление по полу и фенотипу совпадает: ♀ 1:1 и ♂ 1:1.

Данные расщепления в *реципрокных скрещиваниях* полностью соответствуют распределению половых хромосом в мейозе.

В этих экспериментах (Т.Г. Морган) **впервые была доказана роль хромосом в наследственности и локализация генов в хромосомах.**

Постановка скрещиваний. Ставятся *реципрокные* скрещивания *виргинных* самок линии *white* (*w*) и линии дикого типа (с получением F₁ и F₂).

Первое направление скрещивания

♀ *white* × ♂ *дикий тип*

Второе направление скрещивания

♀ *дикий тип* × ♂ *white*

Для постановки скрещиваний можно использовать и другие аллели гена *white*:

- *w^e* (эозиновый),
- *w^a* (абрикосовый),
- *w^p* (пурпурный),
- *w^{co}* (коралловый),
- *w^c* (вишнёвый) и другие.

Известно около 350 аллелей гена *white*, *w*. Мутационные изменения гена *white* относятся к явлению *множественного аллелизма*.

Количественный анализ наследования пары признаков, сцепленных с полом, в *реципрокных* скрещиваниях *виргинных* самок линии *white* (*w*) и линии дикого типа

1 направление

♀ *white* × ♂ *дикий тип*

2 направление

♀ *дикий тип* × ♂ *white*

Таблица 3.3.3.4.1

Схема количественного анализа наследования красной и белой окраски глаз в реципрокных скрещиваниях дрозофилы (Пример)

Расщепление	♀ <i>красноглазые</i> × ♂ <i>белоглазые</i>					♀ <i>белоглазые</i> × ♂ <i>красноглазые</i>				
	Количество особей дрозофилы в F ₁ и F ₂									
	Красногла- зые		Белогла- зые		Все- го	Красногла- зые		Белогла- зые		Все- го
	♀	♂	♀	♂		♀	♂	♀	♂	
Первое поколение F ₁										
Фактическое(p)	256	226	-	-	482	215	-	-	183	398
Формула расщеп- ления	1	1	Нет	Нет	2	1	Нет	Нет	1	2
Теоретически ожи- даемое (q)	241	241	-	-	482	199	-	-	199	398
Отклонение d d ²	+15 225	-15 225				+16 256			-16 256	
$\chi^2 = \sum \frac{\partial^2}{\underline{\underline{q}}}$	$\chi^2 = 0,93 + 0,93 = 1,86$ $\gamma = 1, p < 0,05$					$\chi^2 = 1,29 + 1,29 = 2, 58$ $\gamma = 1, p < 0,05$				
Второе поколение F ₂										
Фактическое рас- щепление (p)	312	163		129	604	130	151	160	127	568
Формула расщеп- ления	2	1	Нет	1	4	1	1	1	1	4
Теоретически ожи- даемое (q)	302	151		151	604	142	142	142	142	568
Отклонение d d ²										
$\chi^2 = \sum \frac{\partial^2}{\underline{\underline{q}}}$	$\chi^2 = 0,33 + 0,95 = 4,49$ $\gamma = 2, p < 0,05$					$\chi^2 = 1,01 + 0,57 + 2,28 + 1,57$ $= 5,44 \gamma = 3, p < 0,05$				

Примечание: γ – число степеней свободы.

Выводы:

Отклонения фактических данных от теоретически ожидаемого расщепления носят случайный характер, т. к. $\chi^2_{\text{эмпирич.}} < \chi^2_{\text{стандартных значений}}$.

Эмпирические расщепления по фенотипу соответствуют теоретически ожидаемым результатам.

3.3.5. Установление группы сцепления генов

Работа по локализации неизвестного гена состоит из двух этапов:

- Определение группы сцепления.
- Определение локуса гена в хромосоме.

3.3.5.1. Определение группы сцепления с помощью рецессивных маркеров

В качестве *тестора* можно использовать линию, в которой маркированы все хромосомы дрозофилы, кроме половой:

- вторая хромосома - *brown (bw)*, коричневые глаза,
- третья хромосома *ebony (e)*, черное тело,
- четвертая хромосома *eyeless (ey)*, отсутствие глаз.

Виргинных самок тесторной линии скрещивают с носителем картируемой мутации. В данном случае используется доминантная мутация *Mut* (ген локализован в третьей хромосоме дрозофилы).

Самцов F_1 снова скрещивают с виргинными самками вновь из тесторной линии (рис. 3.3.5.1.1.)

Выводы:

- Если в F_2 мутация *Mut* проявляется только с маркерами второй и четвертой хромосом (*bw* и *ey*) и никогда с маркером третьей, значит, этот мутантный ген располагается в третьей хромосоме.
- Если картируемая мутация никогда не проявляется одновременно с маркерами второй и четвертой хромосом, то она локализована во второй или четвертой хромосоме.

• 3.3.5.2. Определение группы сцепления генов с помощью доминантных маркеров

- Для определения группы сцепления генов можно использовать линию с четырьмя доминантными маркерами:
- 2 хромосома-*Cy (Curly)*, загнутые вверх крылья;
- 2 хромосома *L (Lobe)*, дольчатые глаза;
- 3 хромосома *D (Dichaete)*, растопыренные крылья;
- 3 хромосома *Sb (Stubble)*, укороченные толстые щетинки.
-
- Все перечисленные мутации доминантны, но с рецессивным летальным действием. Гомозиготные мутанты гибнут. Половая X-хромосома и четвертая хромосома в данной схеме не помечены. Скрещивают особей линии с четырьмя доминантными маркерами с линией, гомозиготной по картируемой рецессивной мутации *mut (вторая хромосома)*. Среди потомков F_1 отбирают самцов любого из классов, затем проводят анализирующее скрещивание.

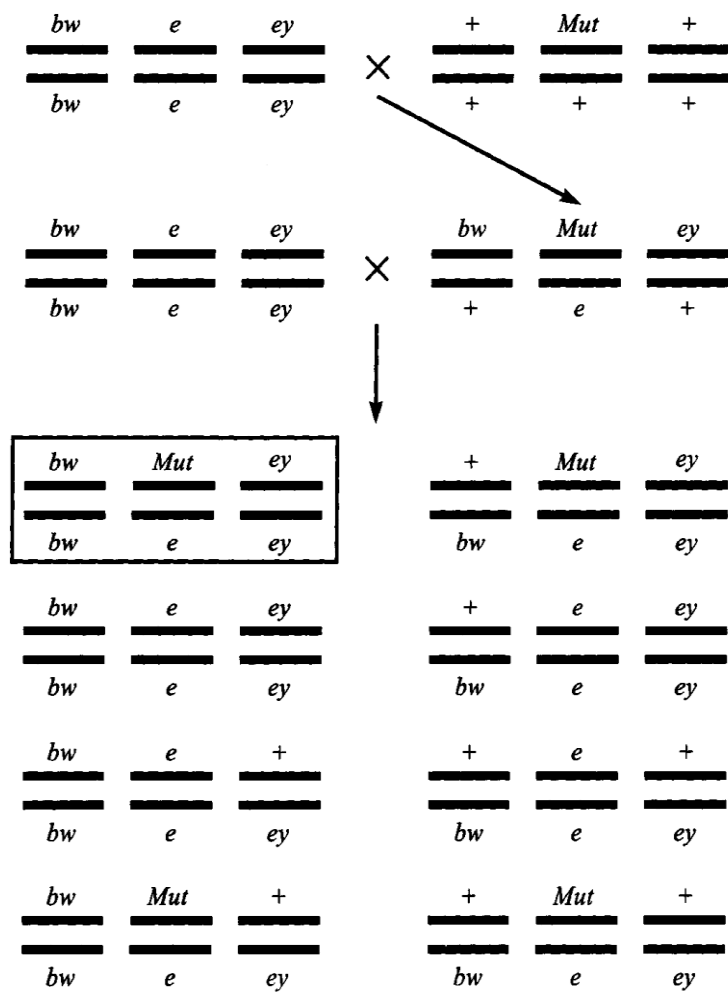


Рис. 3.3.5.1.1. Система скрещиваний дрозофилы для картирования гена в группе сцепления с помощью рецессивных маркеров «у».

Примечание: +++ нормальные аллели генов - *bw*, *e*, *ey*.

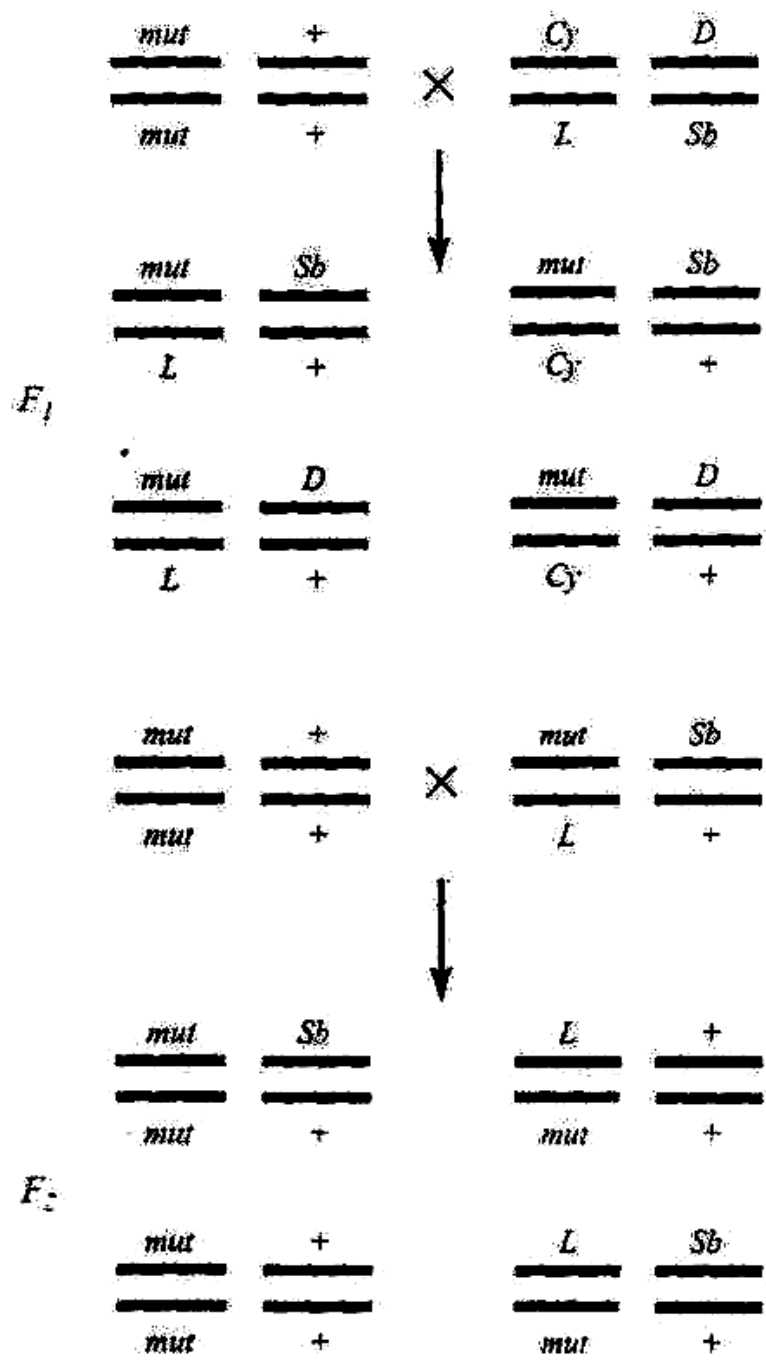


Рис. 3.3.5.2.1. Схема скрещиваний для картирования гена в группе сцепления с помощью доминантных маркеров у дрозофилы
Примечание: ++++ - нормальные аллели генов *Cy*; *L*; *D*; *Sb*.

Анализ результатов

- Если мутантный ген *mut* локализована во второй хромосоме, то она проявится у особей с признаком *Sb* или *D* или у особей без маркерных признаков и не проявится у мух с маркерами второй хромосомы.

- Если мутантный ген *mut* локализована в третьей хромосоме, то она проявится у особей с признаком *L* или *Cy* и у мух без маркерных признаков, но не проявится у особей с маркерами третьей хромосомы.
- Если мутантный ген *mut* локализована в четвёртой хромосоме, то она проявится у половины мух с признаком *L* или *Cy*, у половины мух с признаком *Sb* или *D* и у половины мух без маркеров.

3.3.6. Кроссинговер. Локализация гена в группе сцепления

В каждой хромосоме локализовано множество генов, составляющих (по Т.Г. Моргану) группу сцепления генов. Если бы сцепление генов было полным, то гены, входящие в одну группу сцепления, всегда передавались потомкам в той же комбинации, в какой они были у родителей. Однако, благодаря тому, что в профазе - I мейоза происходит перекрест гомологичных хромосом и обмен их участками (кроссинговер), сцепление генов нарушается. Возникают новые комбинации генов в гаметах и новые сочетания признаков у потомков. Чем дальше в хромосомах локализованы гены, тем чаще они рекомбинируются, поэтому частота кроссинговера (в % перекреста) является мерой расстояния между генами. Сцепленное наследование и величина кроссинговера выявляется при анализе потомков от анализирующего скрещивания тригетерозиготы, в котором преобладают формы с исходными (родительскими) сочетаниями признаков, и обнаруживается небольшое количество форм с новыми комбинациями признаков.

Величина (частота) кроссинговера устанавливается отношением числа рекомбинантных особей к общему числу беккроссов в процентах. При отсутствии сцепления генов (независимое наследование) все типы потомков при анализирующем скрещивании встречаются с равной частотой.

Анализ наследования генов, локализованных в одной хромосоме
(сцепленных генов)

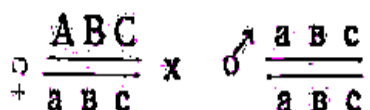
$$\begin{array}{c}
 \text{P} \quad \quad \quad \begin{array}{c} \text{ABC} \\ \hline \text{abc} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{abc} \\ \hline \text{abc} \end{array} \\
 \quad \quad \quad \begin{array}{c} \text{F}_1 \quad \begin{array}{c} \text{ABC} \\ \hline \text{abc} \end{array} \end{array}
 \end{array}$$

Такая форма (F_1) является тригибридом (*тригетерозиготой*), которая образует $2^3 = 8$ типов гамет. Если бы пары генов *Aa*, *Bb*, *Cc* наследовались независимо, то эти 8 типов гамет образовывались с равной частотой. Однако в рассматриваемом случае этого не наблюдается, поскольку 8 ти-

пов бекроссов (потомков от анализирующего скрещивания) возникают с разной частотой. Особи некроссоверного типа (а следовательно и гаметы) образуются наиболее часто; в то время как кроссоверные гаметы, особенно возникшие с участием двойного перекреста, наиболее редки.

Анализирующее скрещивание

Особи F_1 (♀) первого поколения возвратно скрещиваются с тройными рецессивами:



У самцов образуется один тип гамет (abc), у самок 8 типов гамет (табл. 3.3.3.6.1). В потомстве от анализирующего скрещивания образуется 8 типов потомков. Чтобы установить частоту кроссинговера на участке AB , сначала суммируют число особей с реципрокным одиночным перекрестом на участке $A-B$: $37+42=79$. К этому числу необходимо добавить число двойных перекрестов на данном участке ($8+6=14$). Общее число особей с перекрестом на участке AB : $79+14=93$, т. е. 17,85% от общего числа (521) бекроссов F_b . Таким образом, расстояние между локусами AB равно 17,85% кроссинговера.

Таблица 3.3.3.6.1

Пример расчёта частоты кроссинговера:

Гаметы	♀	ABC	abc	Abc	aBC	ABc	abC	AbC	aBc
♂ abc	Гено типы →	$\frac{ABC}{abc}$	$\frac{Abc}{abc}$	$\frac{Abc}{abc}$	$\frac{aBC}{abc}$	$\frac{ABc}{abc}$	$\frac{abC}{abc}$	$\frac{AbC}{abc}$	$\frac{aBc}{abc}$
Количес- тво особей	Все- го 521	150	143	37	42	70	65	8	6
Доля (%)	100	56,23		15,16		25,92		2,69	

Общее число перекрестов на участке BC : $70+65+8+6=149$ или 28,60% от общего числа особей (521). Общая частота перекрестов на участке $A-C$ равна: $17,85\% + 28,60\% = 46,45\%$. Следует отметить, что $8+6=14$ – это особи, образующиеся с участием гамет с двумя перекрестами, которые учтены при подсчете частоты кроссинговера на участке AB и BC . Кроме того, следует учитывать, что при двойном перекресте изменяется только положение генов $B-b$, а положение генов $A-a$ и $C-c$ остается неизменным. Поэтому, если непосредственно определять сцепление генов A и C , то эта величина

будет заниженной. В рассматриваемом случае всего у 214 (41,07%) особей из 521 обнаруживается перекрест на участке A-C, что ниже вычисленной частоты (46,45%) на 5,38 единицы. Поэтому определение расстояний между генами следует вести путем сложения расстояний между исследуемыми и промежуточными генами.

Определение коэффициента коинциденции

Коэффициент коинциденции - отношение частоты эмпирически наблюдавшихся двойных перекрестов к теоретически ожидаемой частоте. В рассмотренном примере происходит 17,85% перекрестов на участке A-B и 28,60% на участке B-C. Теоретически возможное число одновременно происходящих перекрестов на I и II участках было бы $0,1785 \times 0,2860 \times 100 \% = 5,10 \%$. Однако фактически в рассмотренном случае возникло только 14 особей - двойных кроссоверов, что составляет лишь 2,69%, т.е. ниже теоретически ожидаемой величины.

Причина этого - явление *интерференции*, состоящее в том, что перекрест в определенной точке хромосомы подавляет перекрест на прилегающем участке (Т.Г. Морган, 1937). Коэффициент совпадения (или коинциденции) в рассматриваемом примере равен: $2,69 / 5,10 = 0,53$. При полном отсутствии интерференции коэффициент коинциденции равен 1.

3.3.6.1. Кроссинговер в X-хромосоме дрозофилы

Для изучения кроссинговера в половой хромосоме используются виргинные самки линии *y ct v* (*yellow cut vermillion*), меченые тремя рецессивными генами X-хромосомы:

- *yellow* (*y*)- ген, определяющий желтый цвет тела у дрозофилы;
- *cut* (*ct*) – ген, определяющий обрезанный край крыловой пластинки;
- *vermillion* (*v*) – ген, определяющий ярко-красную окраску глаз.

Самки линии *y ct v* скрещиваются с самцами линии дикого типа:

$$\text{♀ } \frac{y \ ct \ v}{y \ ct \ v} \times \text{♂ } \frac{+++}{+}$$

↓ Для изучения кроссинговера в половой X-хромосоме дрозофилы используются виргинные самки линии *y ct v*, , которых скрещивают с самцами дикого типа: ♀ *y ct v* ♂ *+++*.

Далее проводится анализирующее скрещивание: тригетерозиготные виргинные самки F₁ скрещиваются с самцами линии *y ct v* (♂ *y ct v*).

$$\text{♀ } \frac{+++}{y \ ct \ v} \times \text{♂ } \frac{y \ ct \ v}{+}$$

Частоту кроссинговера (расстояние между генами) определяют аналогично предыдущей схеме (табл. 3.3.3.6.1) отношением числа кроссоверных осо-

бей к общему числу бекроссов, учитывая факт, что у самцов дрозофилы кроссинговер отсутствует.

3.3.6.2. Кроссинговер в аутосоме

Для изучения кроссинговера в аутосоме используются виргинные самки линии *b cn vg* (2-я хромосома), которые скрещиваются с самцами линии дикого типа:

$$\begin{array}{ccc} \text{♀ } \underline{b \text{ } cn \text{ } vg} & \times & \text{♂ } \underline{+++} \\ b \text{ } cn \text{ } vg & & +++ \end{array}$$

Гены: *b* (*black*) - чёрное тело,
cn (*cinnabar*) - ген, определяющий ярко-красную окраску глаз,
vg (*vestigial*) - ген, определяющий редукцию крыльев.

Далее проводится анализирующее скрещивание гетерозиготных самок F_1 с самцами, рецессивными по трём парам генов:

$$\begin{array}{ccc} \text{♀ } \underline{b \text{ } cn \text{ } vg} & \times & \text{♂ } \underline{b \text{ } cn \text{ } vg} \\ + + + & & b \text{ } cn \text{ } vg \end{array}$$

3.3.7. Классический метод локализации мутаций

Пример использования классического метода локализации мутаций в половой X- хромосоме: локализация мутации *yellow* (*y*) - желтый цвет тела у дрозофилы.

Постановка скрещиваний.

Линию *yellow* скрещивают с линией-тестором, имеющей два маркерных гена: *sn* (*singed*) - опаленные щетинки, *m* (*miniature*) - маленькие крылья. Вместе с геном *yellow* (*y*) их количество составит *три* в одной хромосоме: *y*, *sn*, *m*.

Наследование трёх сцепленных генов при анализирующем скрещивании у дрозофилы:

$$\begin{array}{ccc} \underline{y \text{ } sn \text{ } m} & \times & \underline{y \text{ } sn \text{ } m} \\ + \text{ } + \text{ } + & & \text{ } \end{array}$$

↓

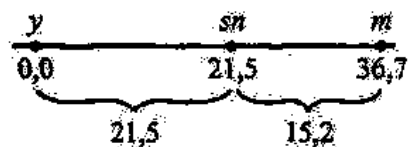
	Типы бекроссов	Генотипы	Количество особей	Всего
1	Некроссоверные потомки	$y \text{ } sn \text{ } m$ $+ \text{ } + \text{ } +$	7337 7334	14671 (66,4%)
2	Одиночные кроссоверы на участке <i>y- sn</i>	$y \text{ } + \text{ } +$ $+ \text{ } sn \text{ } m$	1994 2072	4066 (18,4%)

3	Одиночные кроссоверы на участке $sn - m$	$y\ sn +$ $++\ m$	1360 1314	2674 (12,1%)
4	Двойные Кроссоверы	$y + m$ $+ sn +$	335 330	665 (3,1%)
	Всего Потомков		22 096	

Примечание: +++ - нормальные аллели генов y , sn , m .

В эксперименте всего кроссоверных особей на участке $y - sn$ было получено 21,5%: (18,4 + 3,1), на участке $sn-m$ - 15,2%: (12,1+3,1).

На основе полученных данных эксперимента гены на карте хромосомы можно расположить в следующем порядке:



А.Г. Стертевант пришел к выводу, что расстояние между двумя генами равно сумме (в некоторых случаях разности) расстояний между ними и любым третьим геном, расположенным в той же группе сцепления (закон аддитивности). Однако это справедливо лишь в том случае, если обе составляющие вместе не превышают десятка *сантиморган*. На более протяженных участках хромосом экспериментально определяемое значение расстояния всегда оказывается меньше теоретически ожидаемого.

Максимальная частота рекомбинаций между генами, расположенными на концах хромосомы, составляет 50%, независимо от числа хиазм в тетраде. Взаимное расположение генов можно определить по результатам анализирующего скрещивания тригетерозиготы.

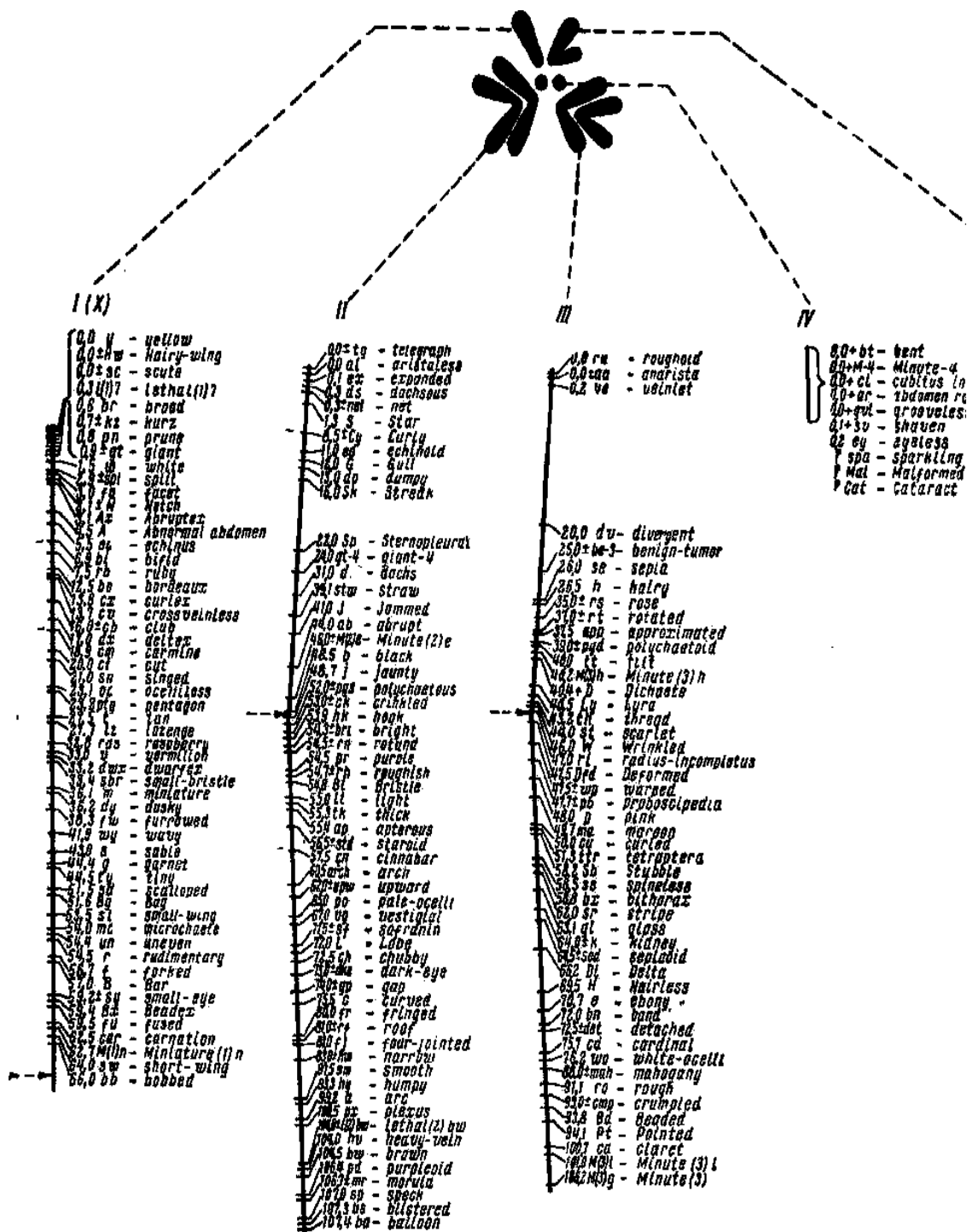


Рис. 3.3.7.1. Карты хромосом (группы сцепления генов) *Drosophila melanogaster* (без Y – хромосомы)

Однако расстояние между двумя маркированными локусами оказывается заниженным, если множественные кроссоверы между ними остаются не учтёнными. Наблюдаемая частота кроссинговера может колебаться из-за вариаций в объёме выборки, температуры, жизнеспособности. Стандартные кроссоверные карты строятся при оптимальных для перекрёста условиях.

На основе большого количества исследований методом генетического анализа были составлены *генетические карты хромосом дрозофилы* (рис. 3.3.7.1). Номер группы сцепления генов обозначен римскими цифрами (I-IV). Цифрами на генетических картах обозначены локусы генов, а расстояние между генами и нулевым локусом хромосомы в процентах кроссинговера. Стрелками указано расположение центромеры. В 1939 году К. Б. Бриджесом был опубликован широко используемый (в «Drosophila Information Service», No. 9, 1939) список изученных мутационных линий дрозофилы (приложение 2).

В настоящее время составлены более подробные [23] генетические (и цитологические) карты хромосом (И.А. Захаров, 1979 стр. с. 55-80) и алфавитный список генов *D. melanogaster* (с. 82-87). Составлены кроссоверные генетические карты для многих организмов (Захаров, 1979; O'Brien, 1982; Lindsley, Ashburner M., 1989; Zimm, 1992 и другие).

Таблица 3.3.7.1

**Соотношение значений размеров кроссоверной
и молекулярной карты генов (в парах нуклеотидов)**

Виды	Размер генома в парах нуклеотидов (a)	Число кроссоверных единиц карты в геноме (b)	Размер кроссоверной единицы в парах нуклеотидов (a/b)
Фаг T4	$1,6 \times 10^5$	800	200
<i>E. coli</i>	$4,2 \times 10^6$	1 750	2 400
Дрожжи	$2,0 \times 10^7$	4 200	5 000
Грибы	$2,7 \times 10^7$	1 000	27 000
Нематоды	$8,0 \times 10^7$	320	250 000
Дрозофила	$1,4 \times 10^8$	280	500 000
Мышь	$3,0 \times 10^9$	1 700	1 800 000
Человек (муж.)	$3,3 \times 10^9$	2 809	1 200 000
Человек (жен.)	$3,3 \times 10^9$	4 782	700 000

На частоту кроссинговера влияют различные факторы, можно предположить, что расстояния между генами относительно и не вполне имеют соответствия реальным физическим единицам, например числу нуклеотидов ДНК. Чтобы получить данные о таком соотношении, значение размера кроссоверной и молекулярной карт генов (в парах нуклеотидов) делят на общую длину кроссоверной карты.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ.

- 1) Какими преимуществами обладает дрозофила для цитологического и генетического изучения?
- 2) Каковы возможные причины отклонений от ожидаемых расщеплений при скрещиваниях?
- 3) В чём сущность закона чистоты гамет, и какова роль мейоза в его осуществлении?
- 4) Для чего (и как) применяется анализирующее скрещивание?
- 5) Сколько пар генов должно быть в гетерозиготе, чтобы обнаружить единственный и двойной кроссинговер у дрозофилы?
- 6) Как можно определить положение центромеры в группе сцепления генов?
- 7) Какие данные можно привести в пользу того, что при перекрёсте обмениваются сегменты хромосом, а не отдельные локусы?
- 8) Какое влияние оказывают необнаруженные множественные кроссоверы на определение расстояния между маркированными локусами?

4. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И УЧЁТА ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ.

4.1. Метод Мёллер-5. Обнаружение рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций у дрозофилы (метод Basc)

Метод Мёллер-5 разработан для обнаружения возникающих летальных мутаций в X-хромосоме с помощью генетического анализа. Линия-тестор, созданная Г. Мёллером, имеет X-хромосомы, маркированные генами:

- *Bar*, *B* – доминантная мутация, полосковидные глаза,
- *white apricot*, *w_a* - абрикосовые глаза,
- *scute*, *sc* - бесщетиновые (отсутствие щетинок).

Описанный выше метод также называют *методом Basc*.

В X-хромосоме этой линии дрозофилы имеются две инверсии:

- *sc^{SI}* — крупная инверсия, охватывающая почти всю хромосому;
- *InS* — малая инверсия внутри первой.

Генотип самок М-5

$$\frac{sc^{SI} B J_n S_w^a sc^8}{sc^{SI} B J_n S_w^a sc^8}$$

Генотип самцов М-5

$$\frac{sc^{SI} B J_n S_w^a sc^8}{sc^{SI} B J_n S_w^a sc^8}$$

Наличие инверсий в X-хромосоме линии-тестора обеспечивает отсутствие рекомбинаций, благодаря «запиранию» кроссинговера, т. е. сохранение всех генов, в том числе и возникших летальных мутаций в той же хромосоме, где они появились. Это обеспечивает точный учет частоты возникающих летальных мутаций. В данном случае инверсии в гомозиготном состоянии не летальны. Возникновение мутаций при определённых воздействиях можно изучать у самцов линии дикого типа. На приведённой схеме обозначены только гены-маркеры.

Цель:

- освоение генетического метода обнаружения и учета сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций у дрозофилы;
- ознакомление с цитогенетическим методом анализа мутаций на политенных хромосомах.

Материалом для исследования являются живые объекты: культуры F_2 дрозофилы, полученные от скрещивания самок линии «Мёллер-5» (М-5) и облученных (или обработанных химическими мутагенами) самцов дикого типа из расчета по 25-30 пробирок на каждого студента; 4-5-дневные личинки от скрещивания гетерозиготных по летальным мутациям самок с белоглазыми самцами.

Оборудование:

Комплект оборудования, необходимого для работы с дрозофилой (см. раздел 2.4) и для получения временных препаратов политенных (гигантских) хромосом клеток слюнных желез дрозофилы.

4.1.1. Учет частоты возникновения летальных мутаций

Учет частоты возникающих летальных мутаций ведется на основе анализа результатов скрещивания облученных самцов дикого типа с самками линии «Мёллер-5». Анализируются пробирки F_2 для установления наличия в них тех разных фенотипических классов.

В случае отсутствия летальных мутаций (рис. 4.1.1, слева) в F_2 получают два типа самок и два типа самцов:

- самки типа М-5, т.е. самки с абрикосовыми полосковидными глазами, самки с красными полосковидными глазами;
- самцы типа М-5 и самцы дикого типа.

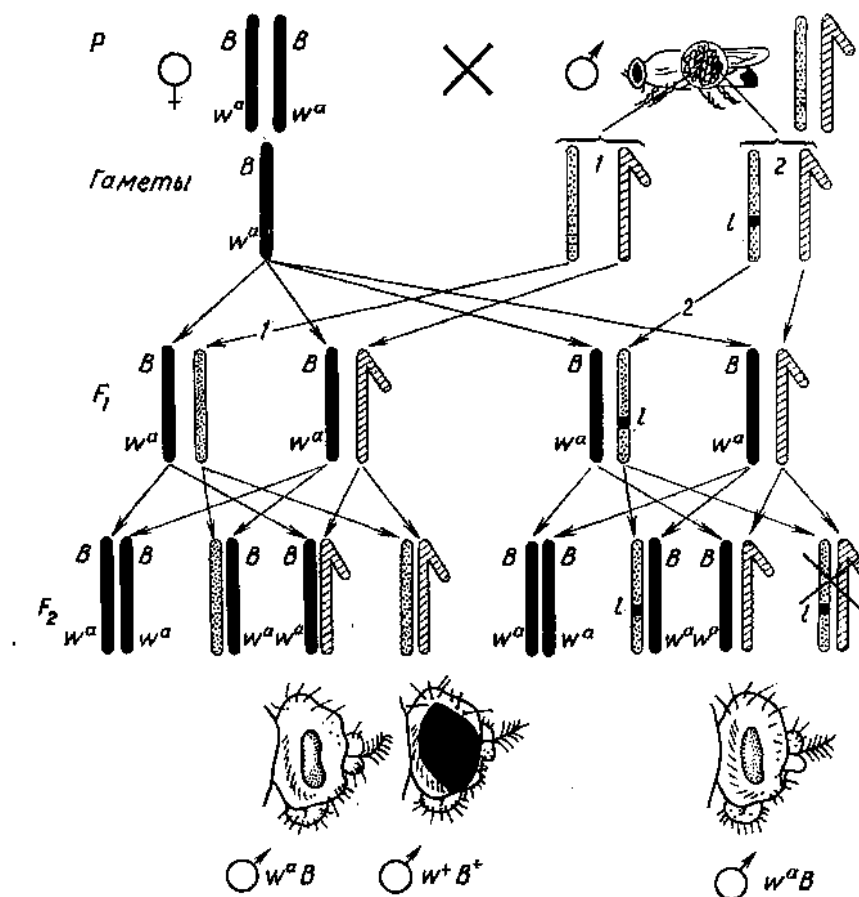


Рис. 4.1.1. Схема метода обнаружения рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций у дрозофилы (метод Мёллер-5).
(М.Е. Лобашев, 1967, стр. 313)

Если в сперматозоиде самца возникла летальная мутация (рис. 4.1.1, справа), в F₂ получаются два типа самок и только один тип самцов. Самцы имеют полосковидные глаза абрикосовой окраски (фенотип М-5), самцы с фенотипом дикого типа не появляются, так как летальная мутация здесь находится в гемизиготном состоянии и вызывает их гибель. Отсутствие самцов дикого типа свидетельствует о наличии летальной мутации в X-хромосоме.

- Если в пробирке, кроме двух типов самок, есть еще два типа самцов, то такую культуру следует считать нормальной.
- Если в пробирке, кроме двух типов самок, есть только один тип самцов (отсутствуют самцы дикого типа), то такую культуру следует отнести к числу летальных.

Таблица 4.1.1.

Учёт частоты возникновения летальных мутаций

Всего культур		Частота возникновения летальных мутаций в опыте (%)
Проанализировано	В т. ч. летальных мутаций	
451	27	$27 \times 100 = 6,0$

Просматривать результаты можно через стекло пробирки без наркотизации мух. Культуры, которые могут быть отнесены к числу летальных, необходимо наркотизировать и проводить осмотр с помощью лупы. Каждый студент анализирует 25-30 пробирок. Далее учет вероятности возникновения летальных мутаций следует вести на основе данных, полученных всей группой (табл. 4.1.1).

Летальные мутации - это культуры, не содержащие самцов дикого типа. *Частота возникновения летальных мутаций* обычно выражается в процентах. Для того, чтобы получить информацию о частоте возникающих мутаций при определённых воздействиях (облучение, воздействие мутагенов), необходимо не только знать частоту возникновения мутации в конкретном опыте, но и рассчитать пределы вероятностей, в которых она может колебаться. Такой расчет можно сделать с учётом ошибки репрезентативности процента ($m\%$) и абсолютной погрешности Δ (дельта).

$$m\% = \pm \sqrt{\frac{f\% \cdot (100 - f\%)}{n}},$$

где:

$m\%$ - ошибка репрезентативности;

$f\%$ - частота мутаций в опыте;

n - число культур.

В приведенном примере: $f = 6,0\%$, $m\% = \pm 1,12\%$.

Доверительные интервалы вероятности возникновения леталей в генеральной совокупности при 5%-ном уровне значимости составляют: $f \pm \Delta$,

$$\Delta = t \times m, f \pm \Delta = f \pm t \times m = 6,0 \pm 1,96 \times 1,12;$$

$t = 1,96$ - критерий надёжности при 5-процентном уровне значимости;

$$f \pm \Delta = (6,0 - 2,19) - (6,0 + 2,19) = 3,81 - 8,19.$$

Это значит, что в аналогичных условиях опыта частота летальных мутаций может колебаться в пределах *от 3,81 – до 8,19 %*.

4.2. Использование метода М-5 для учёта летальных мутаций (абберации хромосом и генные мутации) с помощью цитогенетического анализа

4.2.1. Анализ препаратов политенных хромосом из клеток слюнных желез личинок дрозофилы (для идентификации хромосомных перестроек)

Для установления генетической природы летальных мутаций необходим цитогенетический анализ. Чтобы приготовить препараты политенных хромосом из слюнных желез, необходимо иметь личинок дрозофилы, гетерозиготных по этим мутациям. Временные давленные препараты, окрашенные ацетоорсеином, готовят из слюнных желез личинок в возрасте 4-5 дней. В пробирках, где было установлено наличие летальных мутаций, находились особи (самки), гетерозиготные по этим мутациям, однако их использование в стадии имаго для цитогенетического анализа нецелесообразно. Для получения материала, необходимого для цитогенетического анализа, гетерозиготных по летальной мутации самок предварительно скрещивают с самцом, имеющим нормальную X-хромосому, но несущим ген *white*. Этот ген обладает плеiotропным действием: определяет белую окраску глаз у мух и белые (неокрашенные) мальпигиевы сосуды. Это необходимо для определения среди личинок нужного типа самок.

Результаты скрещивания:

Для анализа необходимо отобрать личинок, несущих летальную мутацию в гетерозиготном состоянии. Это будет только один класс самок (в овале), которых можно отличить по цвету мальпигиевых сосудов. У таких личинок они имеют желтую окраску, так как доминирует аллель дикого типа (в отличие от самок другого генотипа: w^a/w и самцов типа w^a , имеющих неокрашенные, белые мальпигиевы сосуды).

$$\begin{array}{l}
 \text{♀} \quad \frac{sc^{SI} B J n S w^a sc^8}{+ \quad + \quad l} \times \text{♂} \quad \frac{w}{\quad} \longrightarrow \\
 \text{♀} \quad \frac{sc^{SI} B J n S w^a sc^8}{w} \quad \left(\frac{++l}{w} \right) \quad \text{♂} \quad \frac{sc^{SI} B J n S w^a sc^8}{\quad} \quad \frac{++l}{\quad}
 \end{array}$$

Мальпигиевы сосуды хорошо видны под лупой в виде двух тяжей, проходящих вдоль в задней трети тела личинки с брюшной стороны. Из отобранных личинок готовят препараты хромосом клеток слюнных желёз и просматривают с целью идентификации хромосомных аббераций.

Метод М-5 позволяет учитывать все возникающие летальные мутации: не только абберации хромосом, но и генные мутации. Для работы необходим определённый навык идентификации типов перестроек хромосом. При цитогенетическом анализе следует лишь выделить суммарно группу

летальных мутаций, обусловленных крупными aberrациями хромосом, и группу без видимых цитологических нарушений. Это сделать несложно, так как крупные aberrации (транслокации, инверсии и нехватки в гетерозиготном состоянии) образуют петлеобразные фигуры в политенных хромосомах. При их возникновении политенная хромосома раздваивается на два гомолога (рис. 4.2 I).

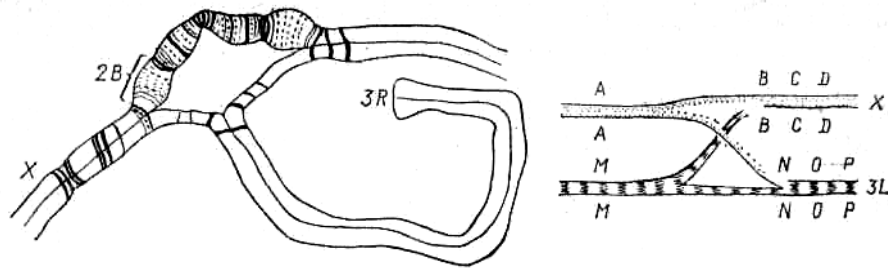


Рис. 4.2.1. Участок политенной хромосомы клетки слюнной железы личинки дрозофилы при наличии транслокации в гетерозиготном состоянии.

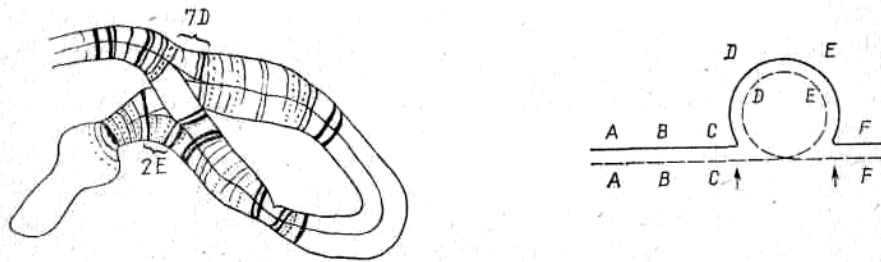


Рис.4.2.2. Слева: участок политенной хромосомы клетки слюнной железы дрозофилы при наличии в гетерозиготном состоянии инверсии в X-хромосоме. Справа указаны точки разрывов.

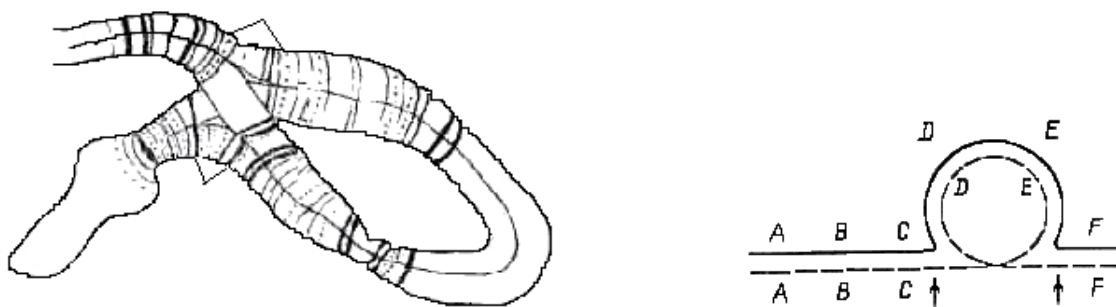


Рис. 4.2.3. Участок политенной хромосомы клетки слюнной железы личинки дрозофилы (при наличии инверсии в гетерозиготном состоянии в X-хромосоме). Справа указаны стрелками места разрывов.

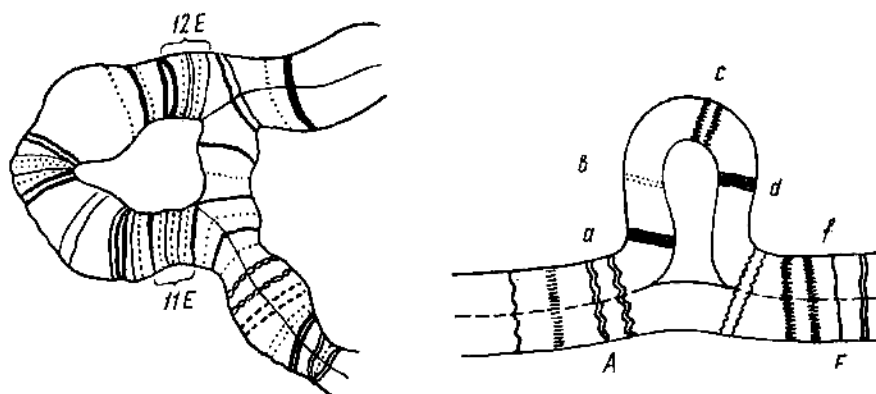


Рис. 4.2.4. Участок политенной хромосомы клетки слюнной железы личинки дрозофилы при наличии крупной делеции.

Препараты, содержащие перестройки хромосом, необходимо зарисовать или получить микрофотографии.

4.3. Получение мутаций и тестирование их на аллелизм

Спонтанные мутации в основном выявляют путём обследования популяций изучаемого организма.

Индукцированные мутации получают и выявляют с помощью различных схем скрещиваний, в которых используют физические и химические мутагены. У дрозофилы прорабатывают такие схемы скрещиваний как CIB для X-хромосомы (Н.Н. Медведев, 1968) или CyL / Pm и D / Sb для второй хромосомы (Н.Н. Орлова, 1991).

Линия CIB «си эль би» характеризуется тем, что одна из X-хромосом маркирована доминантным геном *Var (B)*- *полосковидные глаза и инверсией C*, препятствующей кроссинговеру и обладающей рецессивным летальным действием (*l* - *леталь*). Все изменения, возникающие в X-хромосоме *мутагенизированных* самцов дикого типа, при скрещивании с самками линии CIB передаются (через дочерей) самцам второго поколения и могут быть легко обнаружены.

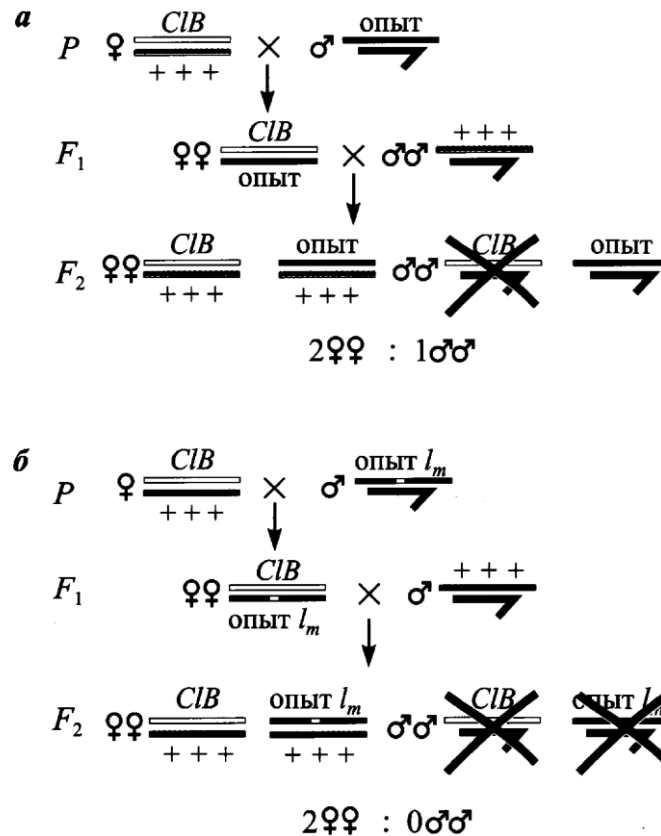


Рис. 4.3.1. Схема метода обнаружения рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций у дрозофилы (метод CIB).

а) результат при отсутствии рецессивных леталей (вверху);

б) результат при наличии рецессивных леталей (внизу).

+++ - нормальные аллели генов.

- В случае отсутствия летальных мутаций в X-хромосоме мутагенизированных самцов дикого типа, в F₂ получают два типа самок и один тип самцов (расщепление по полу и фенотипу ♀ 2:♂ 1).

- Если в сперматозоиде самца возникла летальная мутация, в F₂ получают два типа самок при отсутствии самцов. Расщепление по полу в F₂ происходит в отношении ♀ 2:♂ 0.

Линия *CyL/Pm* – линия сбалансированных леталей (во второй паре хромосом), которая содержит в одной гомологичной хромосоме доминантные мутации *Cy* (*Curly*) – загнутые крылья и *L* (*Lobe*) – маленькие глаза. Каждый из этих генов в гомозиготном состоянии обладает летальным эффектом. Эти мутации связаны с инверсией, подавляющей кроссинговер. В другой гомологичной хромосоме, также содержащей инверсию, присутствует доминантный ген *Pm* (*Plum* – коричневые глаза). С помощью этой линии и метода *CyL/Pm* можно учитывать частоту рецессивных летальных мутаций во второй хромосоме дрозофилы.

Существуют специальные схемы скрещиваний, позволяющие «насытить» мутациями определенный район хромосомы (если предварительно известны делеции на этом участке). Такой метод был разработан С. И. Алиханяном в 1938 г. (СССР), а затем успешно применен американскими учеными Б. Джаддом (Judd et al., 1972) и его сотрудниками. Самок, гомозиготных по балансерной линии *Basc*, несущей доминантную мутацию *Bar* (*B*), скрещивают с обработанными мутагеном самцами. В потомстве отбирают самок, несущих хромосому *Basc* и «мутагенизированную» хромосому, и скрещивают их индивидуально с самцами, имеющими деление в X-хромосоме и дупликацию «X-хромосомных генов» в Y-хромосоме. Наличие дупликации в Y-хромосоме, «перекрывающей» нехватку генов в X-хромосоме, позволяет этим самцам выжить.

В F_2 в каждой пробирке анализируют расщепление среди самок. Если в «мутагенизированной» X-хромосоме возникла летальная мутация в участке, удаляемом делецией, то самки *Bar*⁺ гибнут, поскольку самцы *Bar*⁺ являются носителями этой летали.

В настоящее время мутации у дрозофилы индуцируют также с помощью мобильного элемента генома «Р-элемента» (И.Ф. Жимулёв, 2002). Наличие мутаций, индуцированных таким образом, позволяет быстро выделить и клонировать ДНК данного гена.

В результате *мутагенизации*, как правило, получают большое число мутаций. Для определения количества и типов затрагиваемых генов проверяют все мутации в гетерозиготном состоянии во всех парных сочетаниях (нарушают мутации, изменяют одну и ту же или разные функции).



Рис.4.4.1 .Функциональный тест на аллелизм.

Вверху гетероаллельная комбинация, или компаунд:
внизу дигетерозигота (дигибрид)

Согласно функциональному критерию аллелизма, если неповрежденные мутациями участки генов взаимодействуют комплементарно и образуется гибрид дикого типа, то мутации затрагивают разные гены. Ес-

ли же у гибрида получается мутантный фенотип, это означает, что обе мутации затрагивают один и тот же ген (рис. 4.4.1).

Конечной целью *генетического изучения* организмов любого вида является познание структуры их генетического аппарата. Современные исследования в области молекулярной генетики показали, что *в основе наблюдаемой гомологии органов и физиологических функций лежит гомология генов и кодируемых ими белков*. Число мутаций, выявляемых при сравнении гомологичных генов у разных видов, может служить мерой их эволюционного расхождения. Сравнение последовательностей нуклеотидов в гене гормона роста у мыши и у человека показало, что они различаются по 20 парам нуклеотидов. Чтобы определить скорость изменений в гене, определяют число замен нуклеотидов в расчёте на один сайт. Это число делят на число лет с момента расхождения. Для гена гормона роста это число составляет 4×10^9 замен на один сайт нуклеотида в год. Установлено, что частота замен нуклеотидов может изменяться во времени в разных частях гена и в зависимости от функциональной нагрузки на ген.

В исследовании гомологии генов, контролирующих раннее развитие дрозофилы, а также других организмов, эксперименты на материале дрозофил играют важнейшую роль.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ.

1. *Что включает понятие генетического анализа?*
2. *Каковы этапы генетического анализа?*
3. *Как проводится учет частоты возникновения рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций на основе метода «Мёллер-5»?*
4. *В чём сущность и значение функционального критерия аллелизма, критерия цис-транс-аллелизма?*
5. *Какова роль цитогенетического анализа в установлении природы летальных мутаций?*
6. *Каковы особенности петлеобразных фигур в политенных хромосомах дрозофилы при транслокациях, инверсиях и делециях в гетерозиготном состоянии?*

5. ГОМОЛОГИЯ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ РАННЕЕ РАЗВИТИЕ ДРОЗОФИЛЫ И ДРУГИХ ОРГАНИЗМОВ.

Каким образом белковый продукт одного гена может взаимодействовать с другим геном?

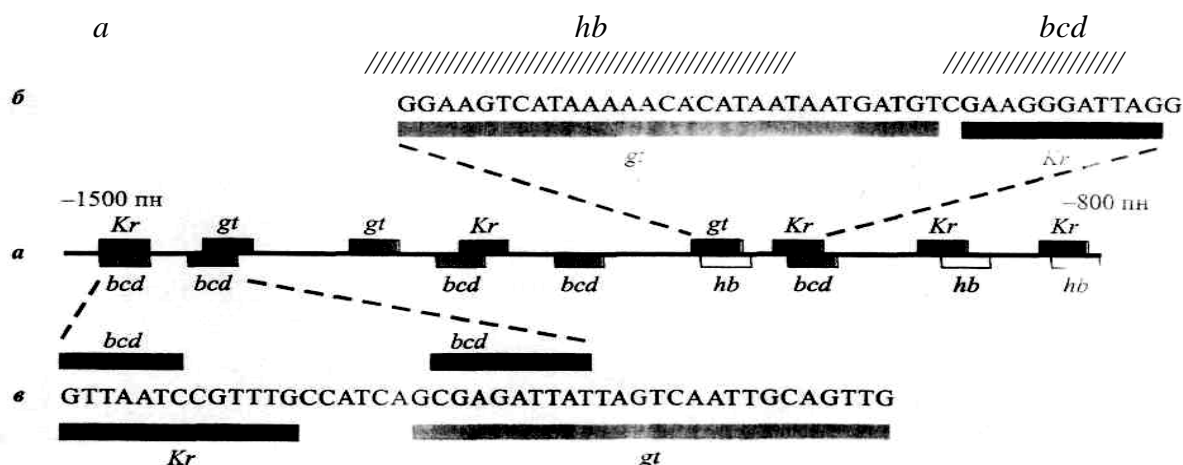


Рис. 5.1. Часть регуляторного участка гена *eve* длиной 700 п.н.

Drosophila melanogaster

a - нить ДНК, на которой изображены участки присоединения белков, кодируемых генами *Kr*, *gt*, *bcd*, *hb*; *б*, *в* - последовательности нуклеотидов, связывающие данные белки, п. н. - пары нуклеотидов.

(Lawrence, 1992. Р. 73 по. И.Ф. Жимулёв, 2002, с 377)

Развитие любого организма - процесс последовательного включения усложняющихся генных систем. При этом продукты одних генов находят специальные точки взаимодействия в регуляторных районах других генов, включают их в активное функционирование, создавая сплошную последовательность включений и выключений генов.

Известно, что регуляторные части генов содержат специфические группы нуклеотидов (*мотивы*), имеющие отношение к определённым сочетаниям аминокислот (доменам) в молекулах белков. Присоединение различных белковых активирующих факторов к соответствующим *мотивам* в регуляторных участках генов приводит к изменениям конфигурации ДНК и началу транскрипции кодирующей части гена (в противоположном случае - блокированию транскрипции).

На рис. 5.1 изображен фрагмент (около 700 п.н.) регуляторной части гена *eve* (*even-skipped*), который контролирует развитие нормальной сегментации тела дрозифилы. *Мотивы* нуклеотидов, связывающих активирующие белки генов *bcd* и *hb*, часто перекрываются *мотивами*, на которые «сажаются» белки, подавляющие транскрипцию (гены *Kr* и *gt*).

Эти данные свидетельствуют о том, что расположение белков, синтезированных в материнском организме, в определенной части яйца имеет первостепенное значение для процесса активирования генов в уже начавшем развитии эмбрионе. Ген *eve* будет функционировать в той части эмбриона, в которой содержится много материнских белков - продуктов генов *bcd* и *hb*, и не будет функционировать в клетках, содержащих избыток продуктов *Kr* и *gt*.

После образования бластодермы и включения зиготических генов начинается формирование сегментального плана строения тела (рис. 1.7.3). Тело взрослой особи насекомого (имаго) состоит из ясно выраженных сегментов. В бластодерме сегментация выявляется лишь по продуктам определенных генов, сегменты четко не выражены и носят название парасегментов. На более поздних стадиях развития сегменты хорошо обособляются друг от друга и легко обнаруживаются (см. раздел 1.7). Эмбриональные сегменты дают начало сегментам взрослой мухи.

Установлено, что сегментный тип организации свойственен не только двукрылым насекомым, но и многим другим животным. Даже у человека на некоторых этапах развития выявляются сомиты - первичные сегменты тела, на которые подразделяется в ходе зародышевого развития мезодерма. Сегменты у дрозофилы формируются в результате действия генов сегментации, 25 из которых исследованы к настоящему времени. В результате мутаций этих генов изменяется число и расположение сегментов.

Таблица 5.1

Группы генов, выделяемые по их мутантному проявлению в фенотипе
(Корочкин, 1999. С. 94).

<i>Gap-гены</i>	<i>Гены pair-rule</i>	<i>Гены сегментной полярности</i>
<i>Kruppel</i> <i>Knirp</i> <i>hunchback</i> <i>giant</i> <i>tailless</i> <i>huckebein</i>	<i>hairy</i> <i>even-skipped</i> <i>runt</i> <i>fushi tarazu</i> <i>odd-paired</i> <i>odd-skipped</i> <i>sloppy-paired</i> <i>paired</i>	<i>engrailed</i> <i>wingless</i> <i>cubitus interruptus</i> <i>hedgehog</i> <i>fused</i> <i>armadillo</i> <i>patched</i> <i>gooseberry</i>

Гены сегментации разделяются на три большие группы, выделяемые по их мутантному проявлению в фенотипе:

- *Gap-гены*,
- *гены pair-rule*,
- *гены сегментной полярности*.

Мутации группы *Gap* (от англ. *gap* - брешь) приводят к потере нескольких прилежащих сегментов тела, в результате чего в рисунке сегментации образуется пустота или брешь.

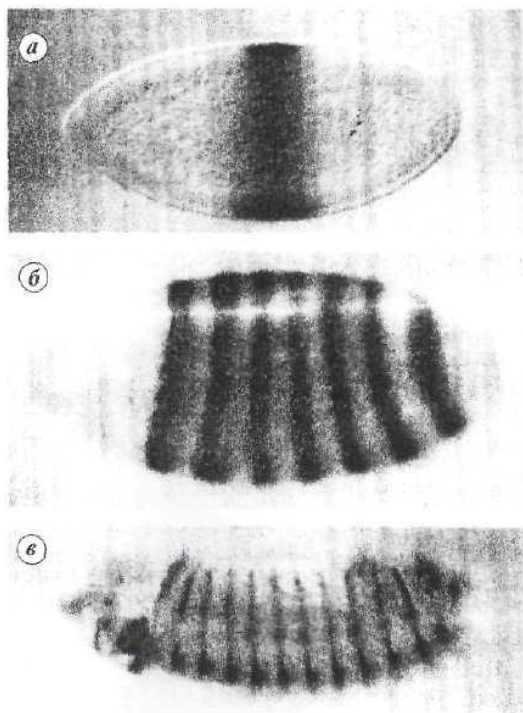


Рис. 5.2. Иерархия действия генов сегментации.

Последовательное подразделение эмбриона на широкие домены (а), парасегменты (б), компартменты (с) .

Gehring, 1998.
Р. 117):

а) в результате экспрессии гена *Kruppel* (*Gap*-группа) на пребластодермальной стадии выявляется продукт этой экспрессии (РНК или белок) в виде темной полосы;

б) экспрессия гена *fushi tarazu* на пребластодермальной стадии - образуется семь парасегментов, в которых выявляется продукт этого гена (темные полосы);

в) экспрессия гена *engrailed* из группы сегментной полярности на поздней стадии сегментации.

Мутации в группе генов *pair-rule* (или генов «правила парности») приводят к утрате одного и того же фрагмента в каждом втором сегменте. У мутантов по генам сегментной полярности определенные части сегментов заменены структурами, представляющими зеркальные отражения прилежащих половин сегментов.

Установлена иерархия действия генов сегментации. Гены из группы *Gap* активируются морфогенами, кодируемыми генами с материнским эффектом и располагающимися в яйце по градиенту. Действие *Gap*-генов приводит к формированию широких доменов в эмбрионе (рис 5.2), каждый из которых будет потом развиваться в несколько более мелких сегментов. Затем включаются гены группы *pair-rule* и сегментной полярности.

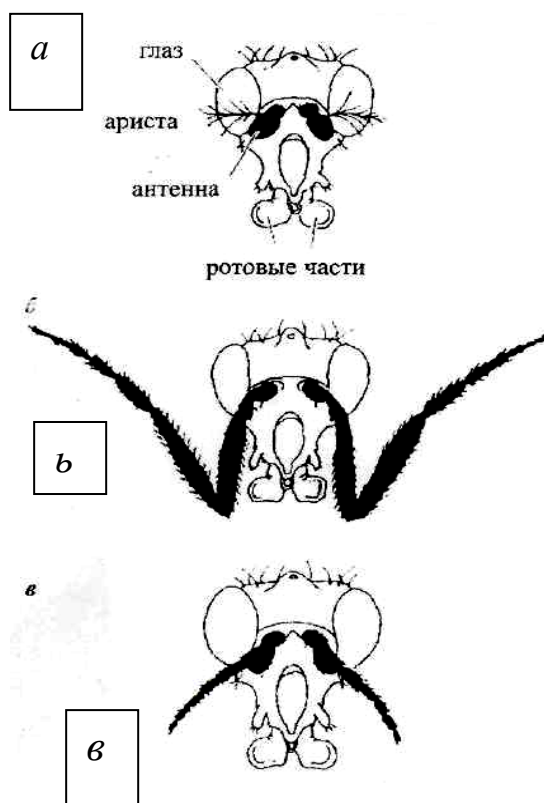


Рис. 5.3. Голова дрозофилы дикого типа (а) и гомеозисные превращения антенны (б) и аристы (в)

в ногу
в результате мутаций *Antennapedia* и *Aristapedia*

После того, как завершено формирование сегментации, вступают в действие «гомеозисные» гены, которые контролируют развитие определённой части тела из соответствующего сегмента. В результате гомеозисной мутации из данного сегмента развивается какая-то другая часть тела (рис. 5.3). Среди гомеозисных наиболее известны гены *bithorax-complex* (BX-C) и *Antennapedia-complex* (Ant-C).

Термин «гомейозис» был предложен У. Бэтсоном (1894). Он дал широкое определение для группы явлений варьирования признаков, в результате которого «нечто изменяется в похожесть на что-то другое». У особи вместо одних частей тела появляются другие, которые в норме должны быть расположены в другом сегменте тела. Первую гомеозисную мутацию: *bithorax* у дрозофилы обнаружил К. Бриджес в 1915 г, затем в 1926 г. Е.И. Балкашина открыла вторую гомеозисную мутацию - *Aristapedia*, а в 1937 г. К. Бриджес - *proboscipedia*.

На комбинированной схеме (рис. 5.4, б) показано, что личинка и взрослая муха имеют общий принцип сегментации: головной сегмент (HEAD), три грудных сегмента (PRO проторакальный, T1; MS мезоторакальный, T2; MT метоторакальный, T3), восемь брюшных (AB1-AB8). Каждый сегмент как у личинки, так и у имаго имеет свой набор органов, отличающий его от остальных.

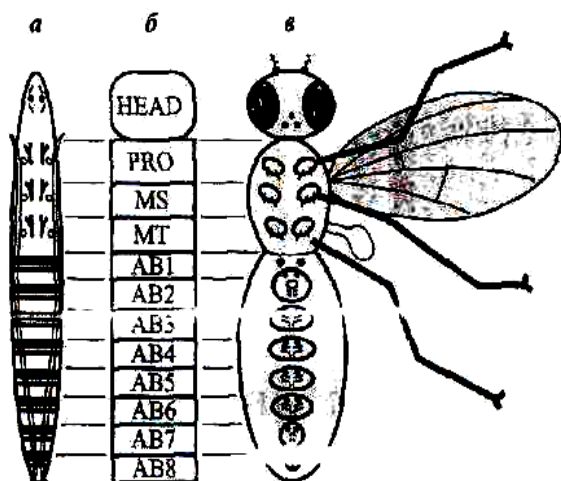


Рис 5.4. Схема сегментального строения

личинки дрозофилы (а),
взрослой мухи (в)

[Lewis, 1978].

Личинки и имаго дрозофилы имеют ярко выраженные сегменты: один головной, три грудных и восемь брюшных, каждый сегмент имаго содержит уникальный набор дифференцированных морфологических структур. Например, мезоторакальный сегмент несет пару крыльев и пару ног, метоторакальный - пару ног и пару гальтеров - особых булавовидных образований, помогающих удерживать равновесие в полете. Характерный набор можно найти и на сегментах личинки (рис. 5.4).

По мнению Э. Льюиса (США), мухи эволюционировали из насекомых, имевших четыре крыла, а насекомые, в свою очередь, произошли из членистоногих, имевших множество ног. В ходе эволюции у мух должны были сформироваться несколько групп генов: подавляющих развитие ног на брюшных сегментах многоножкоподобных предков и второй пары крыльев. Также должна была появиться группа генов, отвечающих за формирование новых структур: гальтеров и брюшных сегментов. Одним из генов, влияющих на эти процессы, является *BX-C*. В ходе своих экспериментов Э. Льюис полностью удалил ген *BX-C* с помощью небольшой делеции. Без этого гена эмбрион развивается до определенной стадии, затем гибнет. Погибший эмбрион имел характерную морфологию: у него был проторакальный сегмент, а все остальные мезоторакальные. Если бы этот организм вырос во взрослую муху, она имела бы 10 пар крыльев и 10 пар ног. Э. Льюис сделал вывод о том, что функция гена *BX-C* заключается в инактивации генов, формирующих ноги и крылья во всех последующих после второго торакального сегментах, и в развитии всех структур на брюшных сегментах.

Дальнейшие эксперименты показали, что комплекс *BX-C* содержит три различных гена: *Ubx*, *abd-A* и *Abd-B*. Каждый из этих генов контролирует формирование определенной группы сегментов. Мутации этих генов заставляют все последующие сегменты формироваться подобно одному из предыдущих, и генетический порядок мутаций грубо соответствует пространственному расположению органов по оси тела.

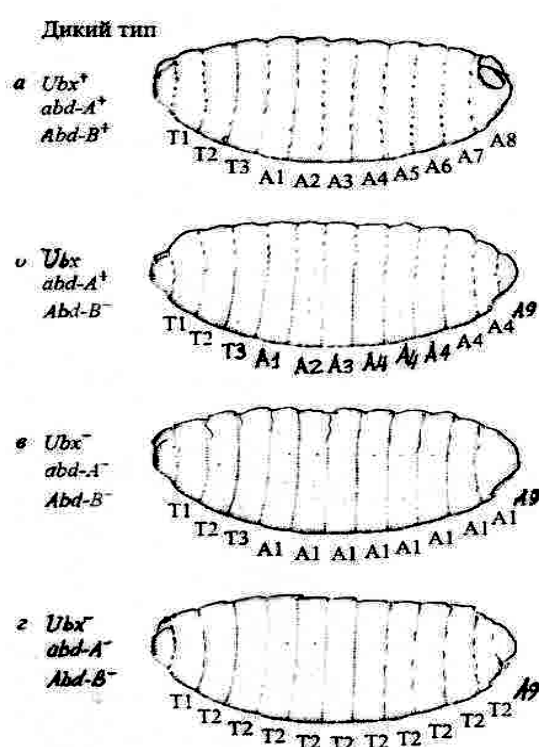


Рис. 5.5. Схема нарушений дифференцировки в результате мутаций генов

Ubx, *abd-A* и *Abd-B* (Lawrence. 1992. P. 112):

а - все гены работают нормально, у эмбриона нормально развиты грудные (T1-T3) и брюшные сегменты (A1-A8):

б - г — нарушения сегментации в результате мутации одного, двух или всех трех генов.

Если все три гена удалены (*Ubx*, *abd-A* и *Abd-B*), нормально развиваются только первый торакальный (T1) и девятый брюшной (A9) сегменты, контролируемые другими генами, все остальные сегменты (T3 и все брюшные) развиваются как T2. Если ген *Ubx* сохраняется, но повреждаются *abd-A* и *Abd-B*, нормально развиваются все грудные сегменты, а все брюшные представлены первым A1. При повреждении гена *Abd-B* нормально развиваются все грудные сегменты, затем брюшные A1, A2 и A3, а остальные сформированы как сегмент A4 (рис. 5.5).

При проведении молекулярно-генетических экспериментов выяснилось, что все три гена комплекса *BX-C* (рис. 5.6), а также ген *Antp* имеют гомологичные друг другу участки: последовательности нуклеотидов в них достигают более 90 % сходства.

Последовательность нуклеотидов, длиной 180 п.н., которая имеет наибольшую гомологию, назвали гомеобоксом. Соответствующий ему фрагмент белковой молекулы (60 аминокислотных остатков) получил название гомеодомена.

К настоящему времени найдены сотни генов, обладающих гомеобоксом: у человека, мышей, птиц, лягушек, червей, жуков. Фактически все представители животного мира, проходящие хотя бы на некоторых этапах развития стадию сегментированного зародыша, имеют гены, обладающие гомеобоксом.

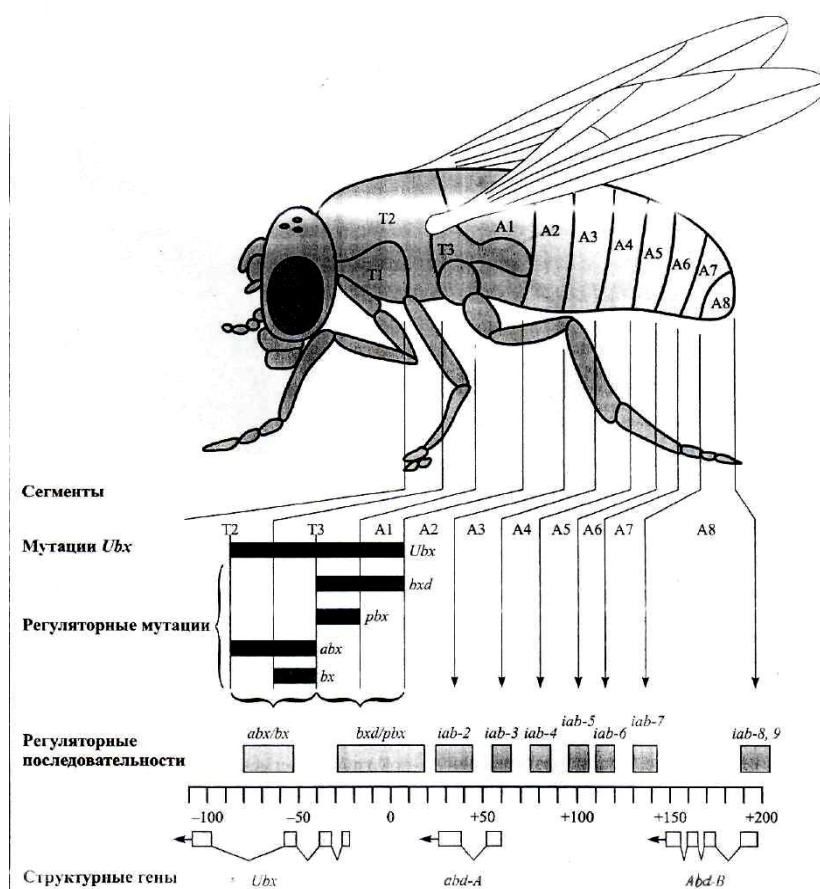


Рис. 5.6. Организация комплекса генов *BX-C* (Russell, 1998. Р. 577).

Три гена: *Ubx*, *abd-A* и *Abd-B* занимают участок ДНК, длиной 300 п.н., считываются справа налево. Над картой ДНК показаны регуляторные мутации, которые влияют на развитие различных сегментов тела мухи

У дрозофилы обнаружено более 20 генов, содержащих в своем составе *гомеобокс*. Установлено, что 180 п.н. *гомеобокса* кодируют фрагмент полипептида длиной в 60 аминокислот, скрученный в 4 α -спирали, каждая из которых отделена от другой наклоном оси вращения. Третья из этих спиралей помещается в большую бороздку ДНК, опознает последовательность нуклеотидов и связывается с ними. Такими структурными особенностями обладают ДНК - связывающиеся белки, факторы транскрипции. Процессы взаимодействия нуклеотидов ДНК и аминокислот белка - фактора транскрипции - организованы так, что определенная последовательность нуклеотидов связывается только с определенной последовательностью аминокислот. Поэтому нуклеотиды в *гомеодомене* расположены в консервативной последовательности у представителей разных типов, классов, родов и видов животных. Например, 55 из 60 аминокислот в *гомеодомене* дрозофилы и лягушки (*Xenopus laevis*) оказались одинаковыми.

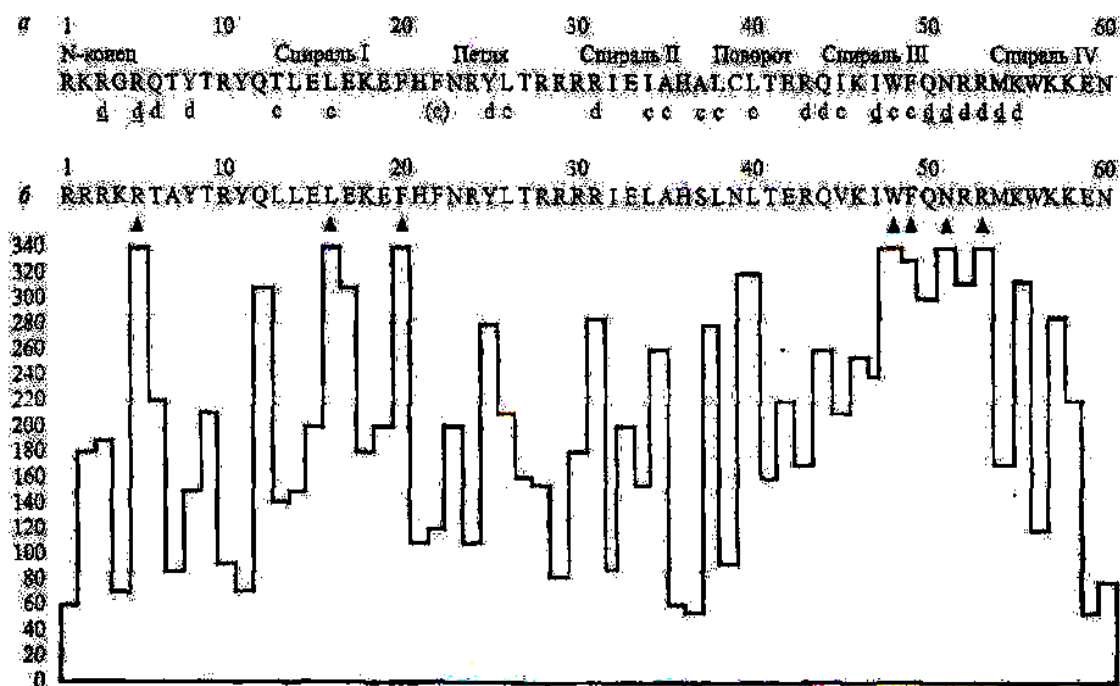


Рис. 5.7. Консервативность организации гомеодоменов (Gehring, 1998. P. 180),

а - структура гомеодомена гена *Antennapedia* у *D. melanogaster* (1-60 - аминокислоты, входящие в гомеодомен, с - аминокислотные остатки, вовлеченные в формирование гидрофобной сердцевины, d - аминокислоты, участвующие в процессе связывания с ДНК, d - аминокислоты, непосредственно контактирующие с ДНК); б - консенсус гомеодомена и встречаемость в данном положении аминокислоты, присущей гомеодомену гена *Antennapedia*. Высота столбиков соответствует числу гомеодоменов, имеющих эту аминокислоту в данном положении.

После открытия явления «гомеобокса» у дрозофилы, данная структура была обнаружена у множества представителей *Metazoa* от губок до позвоночных животных, а также человека и высших растений. Исследования этого вопроса на дрозофиле приобрели новый смысл и значение. К 1995 г. было описано 346 последовательностей гомеодомена. Если принять за основу аминокислотную последовательность гомеодомена из гена *Antennapedia*, то окажется, что в семи позициях частота встречаемости одной и той же аминокислоты составляет более 95% (рис. 5.7).

Семейство генов с гомеобоксами у дрозофилы называют *НОМ*-семейством, у млекопитающих - *НОХ*. Доказано, что гены в *НОМ* и *НОХ* в семействах располагаются и считываются в одинаковом порядке (рис. 5.8). Такое расположение гомеозисных генов не абсолютно. У близкого к *D. melanogaster* вида - *D. virilis* в одном кластере находятся гены *Ubx* и *Antp*, но средний ген из комплекса *BX-C* - *Abd-A* расположен отдельно (Allmen et al., 1996).

Описаны разнообразные типы строения и функционирования глаз у животных (рис. 5.9). У дрозофилы мутация *eyeless* (*ey*) полностью прекращает развитие глаза. У мыши и крысы мутации *Small eye* (*Seu*), а у человека - *Aniridia* останавливают развитие глаз и эмбриона в целом. Оказалось, что белки, кодируемые этими генами, являются факторами транскрипции. Степень гомологии этих генов по аминокислотам достигает 97%. При встраивании гена *Seu* из генома мыши в геном дрозофилы у мух формируются глаза, типичные для насекомых.

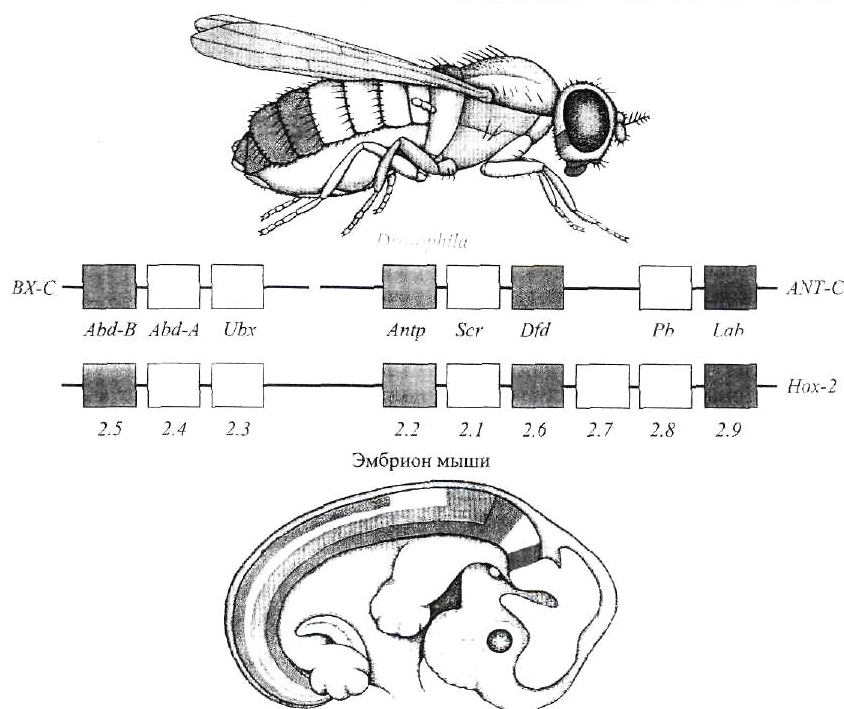


Рис. 5.8. Коллинеарность гомеозисных генов и картины их экспрессии у дрозофилы и мыши (*De Robertis et al., 1990*).

Гомологичные гены и части тела у обоих видов отмечены одинаково

Установлено, что в развитие глаза вовлечено около 2500 генов, и весь каскад генов прямо или косвенно контролируется одним, главным или *матер-геном*. *Мастер-гены* – это гены, контролирующие развитие на ранних этапах эмбриогенеза, которые имеют максимальную гомологию.

Гены, обладающие *гомеобоксом*, контролируют развитие признаков различных организмов, например, таких как дрозофила и мышь.

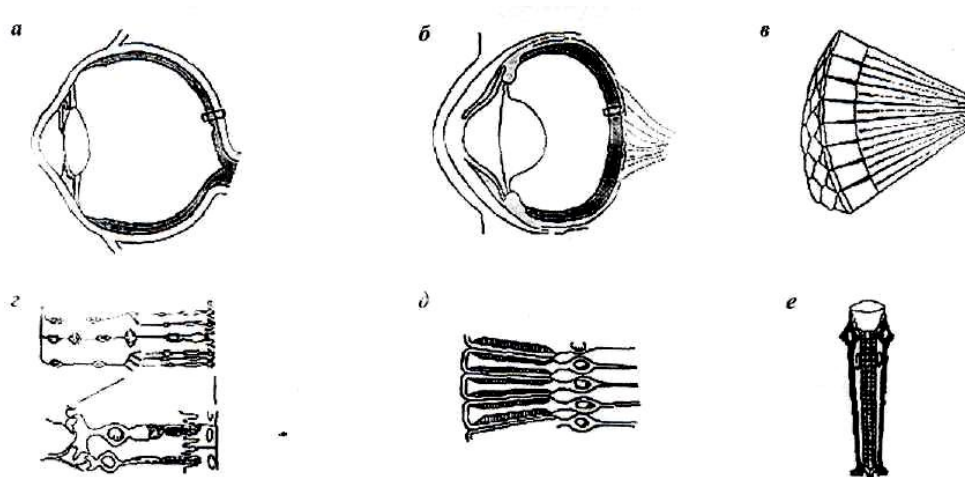


Рис. 5.9. Схема строения глаза (Halder et al., 1995), где *а, г* - человека, *б, д* - кальмара, *в, е* - дрозофилы; *г, д* - разрез сетчатки, *е* - продольный срез через один омматидий.

Частота мутаций, выявляемых при сравнении гомологичных генов у разных видов, может служить мерой их эволюционного расхождения, «молекулярными часами». Установлено, что наибольшая скорость замены нуклеотидов отмечена для последовательностей, имеющих минимальное влияние на функционирование организма (интроны, псевдогены).

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современной генетике возрос интерес к исследованиям на дрозофиле в связи с использованием методов молекулярной биологии, биохимии, генной инженерии. Культивирование эмбриональных клеток и имгинальных дисков способствует решению проблем генетики соматических клеток и генетики развития. Дрозофила – один из важнейших объектов исследования мобильных генетических элементов и супермобильных генов.

Достигнуты большие успехи в области генетики поведения дрозофилы. Лучше всего в этом аспекте изучены гены, контролирующие такие физиологические функции как зрение, обоняние, способность к обучению, брачное поведение, биоритмы (И.Ф. Жимулёв, 1997).

У дрозофилы описано несколько генов, контролирующих зрение. Так, ген *small-optic-lobes (sol)* детерминирует около 50% клеток у мутантных куколок в оптической доле головного мозга. В результате этого нарушается система ориентировки и поведения во время посадки после полёта. Ген *sol* клонирован. Он располагается в участке ДНК размером 14 т.п.н. С него считываются два транскрипта длиной 5,8 и 5,2 т.п.н. Первый транскрипт кодирует белок, состоящий из 1597 аминокислот. Этот белок может блокировать активность других генов.

Дрозофила может различать различные запахи (на личиночной и имагинальной стадии). Обнаружены гены, контролирующие чувствительность особей дрозофилы к запахам альдегидов и эфиров.

Доказано, что взрослые особи дрозофилы способны к выработке условных рефлексов (связывают ощущения от запахов с болевыми ощущениями). Известны гены, влияющие на эффективность обучения. Ген *agnostic* кодирует кальмодулин, ингибирующий белок. Мутанты по этому гену полностью утрачивают способность к обучению.

Открыты гены, контролирующие периодичность физиологических процессов у дрозофилы. Биоритмы отмечены у дрозофилы при откладке яиц, появлении имаго из куколок, брачной «песни» самцов. Установлены мутации, нарушающие ритмику биологических процессов. Во всех изученных случаях часовой механизм включает молекулярную систему обратной связи. Гены, контролирующие циркадные ритмы, выделены у ряда других организмов: нейроспора, млекопитающие (мышь, человек). По полноте исследования генома дрозофила находится на первом месте среди высших эукариотических организмов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ.

1. *Каким образом белки, синтезированные в материнском организме, влияют на процессы активирования генов в начавшем развитие эмбрионе?*
2. *Что такое гены сегментации, какова иерархия их действия?*
3. *Что такое гомеозисные гены и гомеобокс?*
4. *Каковы нарушения дифференцировки в результате мутаций гомеозисных генов?*
5. *Существуют ли гены, обладающие гомеобоксом, у человека и других организмов?*
6. *В чём причины гомологии гомеозисных генов различных в эволюционном отношении организмов?*

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

Таблица 1

Стандартные значения t-критерия Стьюдента (t) при различном числе степеней свободы (γ)

γ	$B_1=0,95$	$B_2=0,99$	$B_3=0,999$	γ	$B_1=0,95$	$B_2=0,99$	$B_3=0,999$
1	12,7	63,7	637,0	13	2,2	3,0	4,1
2	4,3	9,9	31,6	14—15	2,1	3,0	4,1
3	3,2	5,8	12,9	16—17	2,1	2,9	4,0
4	2,8	4,6	8,6	18—20	2,1	2,9	3,9
5	2,6	4,0	6,9	21—24	2,1	2,8	3,8
6	2,4	3,7	6,0	25—28	2,1	2,8	3,7
7	2,4	3,5	5,3	29—30	2,0	2,8	3,7
8	2,3	3,4	5,0	31—34	2,0	2,7	3,7
9	2,3	3,3	4,8	35—42	2,0	2,7	3,6
10	2,2	3,2	4,6	43—62	2,0	2,7	3,5
11	2,2	3,1	4,4	63—175	2,0	2,6	3,4
12	2,2	3,1	4,2	176 и >	2,0	2,6	3,3

Таблица 2

Стандартные значения критерия χ^2 при различном числе степеней свободы (γ)
(с сокращением)

γ	p_1	p_2	p_3	γ	p_1	p_2	p_3
1	3,8	6,6	10,8	8	15,5	20,1	26,1
2	6,0	9,2	13,8	9	16,9	21,7	27,0
3	7,8	11,3	16,3	10	18,3	23,2	29,6
4	9,5	13,3	18,5	11	19,7	24,7	31,3
5	11,1	15,1	20,5	12	21,0	26,2	32,9
6	12,5	16,8	22,5	13	22,4	27,7	34,5
7	14,1	18,5	24,3	14	23,7	29,1	38,1

Примечание: $p_1 \leq 0,05$, $p_2 \leq 0,01$, $p_3 \leq 0,001$ - достоверность (уровень значимости) различий эмпирических и теоретических распределений.

СПИСОК НАИБОЛЕЕ УПОТРЕБИТЕЛЬНЫХ МУТАНТОВ *Drosophila melanogaster*

(По К. Б. Бриджесу; опубликовано в *Drosophila Information Service*, No. 9, 1939) [35].

По степени изученности, четкости проявления и легкости классификации мутанты дрозофилы классифицированы К.Б. Бриджесом на следующие пять категорий (обозначены взятыми в скобки арабскими цифрами 1—5 в конце характеристики каждого мутанта).

1. Мутанты, наиболее изученные и интенсивно используемые в исследованиях, с четкой классификацией, хорошей жизнеспособностью и точной локализацией.
2. Мутанты, аналогичные первой категории, но используются менее интенсивно. Локализованы недостаточно точно.
3. Немногочисленные мутанты с четким проявлением признаков, но локализованы недостаточно точно.
4. Мутанты, менее удобные, но интенсивно используемые в специальных исследованиях. Локализованы не вполне точно.
5. Мутанты, обнаруживающие трансгрессию с диким типом. Локализованы недостаточно точно.
6. Буква «А» при категории обозначает ненормальный перекрест, обязанный данной абберацией.

abdoment rotatum, ar, IV 0,0 +- Закрученное брюшко по часовой стрелке .

Abnormal abdoment. A, I, 4,5. Анормальное брюшко. Во влажных культурах проявляется сильнее, жизнеспособны (2).

abrupt, ab, II, 44,0. Оборванная V продольная жилка (2).

Abruptex, Ax, I, 3,1 ±. Укороченные жилки, крылья дугообразные. Гомозиготы жизнеспособны (2).

anarista, aa, III, 0,0+. Безусый. Аристы уменьшены, не ветвящиеся (4).

approximated, app, III, 37,5. Сближенные поперечные жилки, лапки 4-члениковые (1).

arc, a, II, 99,2. Дугообразные, широкие крылья, загнуты книзу; поперечные жилки сближены (2).

apterous, ap, II, 55,4. Бескрылый. Жужжальца отсутствуют. Стерильны (4).

arch, arch, II, 60,5. Арковидный. Крылья загнуты вниз по обеим осям (2).

aristaless, al, II, 0,0. Безусый. Аристы редуцированы, скутеллярные щетинки расходятся в стороны (1).

aristapedia, arp, III, 58,5. Усоногий. Аристы видоизменены в ножки. Аллеломорф *spinelless* (см. ss) (1).

Примечание: цифрами обозначены группы сцепления генов (I, II, III, IV, V) и локус гена в хромосоме, например: 0,0; 55,4; 58,5.

Bag, Bg, I, 51,6. Мешковидный. Крылья короткие, притуплены, пузырьчатые. Самцы летальны (2).

balloon, ba, II, 107,4. Баллонообразный. Крылья надуты, добавочные жилки. Оптимум ниже 20° (4).

band, bn, III, 72,0. Полосковидный. Темная полоска на груди (2).

Bar, B, I, 57,0. Полосковидные глаза. Гомозиготы жизнеспособны. Дупликация (1).

Beaded, Bd, III, 93,8. Вырезанный. Краевая жилка крыла неоднократно прервана. Гомозиготы летальны (2).

Beadex, Bx, I, 59,4. Зазубренный. Крылья зазубрены. Гомозиготы жизнеспособны (1).

benign tumor, Be-3, III, 25,0 ±. Доброкачественные опухоли. Не летальные меланотические опухоли (5).

bent, bt, IV, 0,0. Изогнутый. Крылья изогнуты вниз, ножки узловатые. Оптимум 29° (2).

bifid, bi, I, 6,9. Жилки слиты у основания крыла (1).

bithorax, bx, III, 58,8. Удвоение груди. Метаторакс сходен с мезотораксом. Жужжальца крылообразные (2).

black, b, II, 48,5. Черный. Тело, ножки, жилки очень темные (1).

blistered, bs, II, 107,3. Пузыреобразный. Крылья уменьшены, пузырчатые, добавочные жилки. Оптимум ниже 20° (2).

bobbed, bb, I, 66,0. Подстриженный. Щетинки уменьшены, склериты неправильны (1).

bordeaux, bo, I, 12,5. Бордовый цвет глаз. Трансгрессия с диким типом (5).

bright, bri, II, 54,3 ±. Ярко-красный цвет глаз (4).

Bristle, Bl, II, 54,8. Щетинки укорочены. Гомозиготы полуметальны (1).

broad, br, I, 0,6. Ширококрылый. Крылья широкие укорочены (2).

brown, bw, II, 104,5. Коричневоглазый. Цвет глаз от коричневатого до гранатового (1).

cardinal, cd, III, 75,7. Ярко-красный. Глаза шарлаховые, глазки бесцветные (2).

carmine, cm, I, 18,9. Карминный. Темно-рубиновый цвет глаз (1).

carnation, car, I, 62,5. Алоглазый. Темно-рубиновый цвет глаз (1).

Cataract, Cat, IV, Грубые глаза. Гомозиготы летальны (3).

chubby, ch, II, 72,5. Укороченный. Личинки, куколки, взрослые укорочены (4).

cinnabar, cn, II, 57,5. Киноварноглазый. Цвет глаз яркий, шарлаховый, глазки бесцветны (1).

claret, ca, III, 100,7. Рубиновоглазый. Цвет глаз похож на цвет вина claret (1).

club, cb, I, 16,0 ±. Скомканнокрылый. Крылья взрослых мух похожи на крылья куколки (2).

crinkled, *ск*, II, 53,0 ±. Складчатокрылый. Крылья складчатые, морщинистые. Жизнеспособность низкая (5).

crossveinless, *cv*, I, 13,7. Отсутствует или недоразвита поперечная жилка крыла (1).

crumpled, *сmp*, III, 93,0+. М о р щ и н и с т о к р ы л ы й. Крылья уменьшены, смяты (4).

cubitus interruptus, *ci*, IV, 0,0 + +. Кубительная (VI продольная) жилка крыла прервана. Оптимум 19° (1).

curled, *cu*, III, 50,0. Загнутые крылья. Тело темное, задние скутеллярные щетинки перекрещиваются (1).

curlex, *cx*, I, 13,6. Крылья загнуты вверх (2).

curved, *c*, II, 75,5. Крылья тонкие, растопырены, приподняты и закручены (1).

Curly, *Cy*, II, 8,5±. Крылья загнуты вверх. Гомозиготы летальны. Инверсии (3A).

cut, *ct*, I, 20,0. Обрезанный край крыла (1).

dachs, *d*, II, 31,0. Таксоногий. Лапки 4-члениковые, жилкование неправильное (2).

dachsous, *ds*, II, 0,3. Таксообразный. Крылья укорочены, поперечные жилки сближены (2).

dark eye, *dke*, II, 73,0±. Темноглазый. Цвет глаз мягкий, темный, блеклый (3).

Deformed, *Dfd*, III, 47,5. Д е ф о р м и р о в а н н ы е г л а з а. Глаза уменьшены. Гомозиготы летальны. Оптимум 19° (2).

Delta, *Dl*, III, 6,2. Д е л ь т о в и д н ы й. Жилки на концах утолщены. Гомозиготы летальны (1).

deltex, *dx*, I, 17,0. Д е л ь т о 1 в и д н ы й. Жилки утолщены, дельтовидны. Гомозиготы жизнеспособны (2).

detached, *det*, III, 72,5 ±. Поперечные жилки прерваны (5).

Dichaete, *D*, III, 40,4 +. Д в у щ е т и н к о в ы й. Крылья растопырены. Гомозиготы летальны. Инверсия (3A).

divergent, *dv*, III, 20,0. Растопыренные крылья. Плодовитость понижена (2).

dumpy, *dp*, II, 13,0. Короткокрылый. На груди воронкообразные углубления (1).

dusky, *dy*, I, 36,2. Закопченный. Крылья уменьшены, темные (1).

dwarf, *dw*, III, 50,0. Карликовый. Размеры тела уменьшены (5).

dwarf ex, *dwx*, I, 33,2. Карликовый. Размеры тела карликовые, крылья грубые (4).

ebony, *e*, III, 70,7. Черный цвет тела (1).

echinoid, *ed*, II, 11,0. Ежеобразный. Глаза увеличены, грубые (1).

echinus, *ee*, I, 5,5. Ежеобразный. Глаза и фасетки дальне увеличены (1).

expanded, *ex*, II, 0,1. Растопыренные крылья. Глаза грубые (2).

eyeless, *ey*, IV, 0,2. Безглазый. Глаза редуцированы частично или полностью (1).

facet, *fa*, I, 3,0. Н рушены форма и расположение фасеток. Глаза грубые, крылья зазубрены (2).

fat, *ft*, II, 12,0. Тучный. Тело укорочено, толстое, поперечные жилки сближены (1).

forked, *f*, I, 56,7. Вильчатые щетинки и волоски утолщены (1).

four-jointed, *ff*, II, 81,0. Лапки 4-члени к о в ы е, крылья укорочены (1).

fringed, *fr*, II, 80,0. Бахромчатый край крыла (2).

frizzled, *fz*, III, 44±. Грудные волоски и щетинки направлены к «с р е д н е й л и н и и тела (3).

furrowed, *fw*, I, 38,3. Бороздчатые глаза (2).

fused, *fu*, I, 59,5. С л и т н ы е ж и л к и в основании крыла. Самки стерильны (2).

gap, *gp*, II, 74±. Прервана IV продольная жилка крыла. Трансгрессия с диким типом (5)..

garnet, *g*, I, 44,4. Г р а н а т о в о г л а з ы й (d).

giant, *gt*, I, 0,9±. Гигантские личинки, куколки и мухи (4).

giant-4, *gt-4*, II, 24,0. Гигантские мухи (5).

glass, *gl*, III, 63,1. Стекловидный. Цвет глаз ослаблен, фасетки слиты в ровную блестящую поверхность (1).

grooveless, *gvl*, IV, 0,0 ±. Скутеллярной бороздки нет.

heavy vein, *hv*, II, 104,0. Утолщенные жилки, задняя поперечная скошена. Оптимум 19° (2).

hook, *hk*, II, 53,9. Крючковатые, изогнутые или обрубленные щетинки (2).

humpy, *hy*, II, 93,3. Горбатый. Крылья короткие, грудь горбатая с углублениями и розетками (2).

Jammed, *J*, II, 41,0. Скомканнокрылый. Крыло низведено до узкой полосы. Гомозиготы жизнеспособны. Оптимум 28° (2).

jaunty, *j*, II, 48,7. Загнутые кверху крылья. Оптимум 25° (2).

kidney, *k*, III, 64,0±. Почковидные глаза (4).

kurz, *kz*, I, 0,7 ±. К о р о т к и е, т о н к и е щетинки (2).

*lethal(1)*7, *l(1)*7, I, 0,3. Летальный. Убивает личинок (2).

lethal(2) brown, *l(2)bw*, II, 104,0±. Летальный. Вероятно, нехватка (4A).

light, *lt*, II, 55,0. Светлоглазый. Желтовато-розовый цвет глаз (1).

Lobe, *L*, II, 72,0. Лопастной. Глаза уменьшены, с вырезкой на переднем крае. Гомозиготы жизнеспособны (1).

lozenge, lz, I, 27,7. Ромбовидный. Глаза сужены, яйцевидные. Самцы стерильны (1).

Lyra, Ly, III, 40,5. Лирообразный. Крылья срезаны с боков, узкие. Гомозиготы летальны. Нехватка (1).

mahogany, mah, III, 88,0 ±. Цвет глаз красного дерева. С возрастом темнеет (5).

Malformed, Mai, IV. Разнообразные дефекты глаз в виде зарубок, ямок, островков и т. д. (5).

maroon, ma, III, 49,7. Каштановый. Блеклый, каштаново-рубинный цвет глаз (4).

microchaete, mc, I, 54,0. Уменьшены число и размеры волосков и щетинок (1).

miniature, m, I, 36,1. Миниатюрный. Крылья сильно уменьшены, темные (1).

Minute (1) n, M (1) n, I, 62,7. Тонкие щетинки. Резкий Minute (2).

Minute(2)e, M(2)e, II, 46,0±. Тонкие щетинки. Умеренный Minute. Самки большей частью стерильны (5A).

Minute(3)g, M(3)g, III, 106,2. Тонкие щетинки. Слабый Minute (4).

Minute(3)h, M(3)h, III, 40,2. Тонкие щетинки. Умеренный Minute. Аллеломорф M(3)33j (4).

Minute (3)l, M(3)l, III, 101,0. Тонкие щетинки. Умеренный Minute (2).

Minute-4, M-4, бороздки нет (1).

Gull, G, II, 12,0 Чайка. Крылья большие, растопырены. Гомозиготы летальны. Нехватка (2A).

Hairless, H, III, 69,5. Бесщетиновые. Некоторые щетинки и .волоски отсутствуют. Гомозиготы летальны (1).

hairy, h, III, 26,5. Волосатый. Добавочные волоски на скутеллюме, жилках, плевре и голове (1).

Hairy-wing, Hw, I, 0,0 ±. Волосатые крылья. Добавочные щетинки и волоски. Гомозиготы жизнеспособны (1).

Notch, N, I, 3,1 ±. Зазубренные крылья. Расположены в области III и IV продольных жилок. Гомозиготы летальны. Известно много аллеломорфов (2).

ocelliless, oc, I, 1,23. Глазки отсутствуют, щетинки неправильны. Самки стерильны (2).

pale-ocelli, po, II, 65, 0. Палевые глазки, почти бесцветные (2).

pentagon, ptg, I, 23,2. Пятиугольный. Темный трезубец и пятиугольное пятно кпереди от скутеллюма (2).

pink, p, III, 48,0. Р о з о в о г л а з ы й. Блеклый, рубиновый цвет глаз (1).

plexus, px, II, 100,5. Сплетения и добавочные жилки (1).

Pointed-wing, Pt, III, 94,1. Заостренные концы крыльев. Гомозиготы летальны (4).

polychaetoid, *pyd*, III, 39,0 + . Многощетинковый. Добавочные щетинки. Оптимум 19° (3).

polychaetous, *pys*, II, 52,0 + . Многощетинковый. Добавочные и удвоенные жилки. Оптимум выше 28° (3).

proboscipedia, *pb*, III, 47,7 + . Ротовые части, видоизменены в ножки. Взрослые мухи нежизнеспособны. Самки стерильны (2).

prune, *pn*, I, 0,8. Черносливовый. Темный, коричнево-красный цвет глаз (1).

purple, *pr*, II, 54,5. Пурпурный цвет глаз (1).

purpleoid, *pd*, II, 106,4. Пурпуровидный цвет глаз (2).

radius incompletus, *ri*, III, 47,0. Продольная жилка прервана (1).

raspberry, *ras*, I, 32,8. Малиновый цвет глаз (1).

roof, *rf*, II, 81,0 + . Крышеобразный. Крылья свисают на стороны (5).

rose, *rs*, III, 35,0 + . Розовоглазый. Розовый, просвечивающий цвет глаз (3).

rotated, *rt*, III, 37,0 + . Брюшко закручено против часовой стрелки (ср. *Abdomen rotatum*) (2).

rotund, *rn*, II, 54,5 + . Округлые крылья; лапки 3-члениковые. Стерильны (5).

rough, *ro*, III, 91,1. Грубоглазый. Грубые глаза уменьшены (1).

roughish, *rh*, II, 54,7 + . Грубоглазый. Глаза умеренно грубые (2).

roughoid, *ru*, III, 0,0. Грубоглазый. Глаза уменьшены, грубые; фасетки беспорядочны (1).

ruby, *rb*, I, 7,5. Рубиновоглазый. Рубиновый цвет глаз (1).

rudimentary, *r*, I, 54,5. Рудиметарнокрылый. Концы крыльев косо срезаны. Плодовитость самок понижена (2).

sable, *s*, I, 43,0. Соболиный. Тело темное (1).

safranin, *sf*, II, 71,5 + . Сафраниновый. Темный, шоколадный цвет глаз (4).

scalloped, *sd*, I, 51,5. Зазубренные края крыльев (1).

scarlet, *st*, III, 44,0. Шарлаховый, багряно-красный цвет глаз, глазки бесцветные (1).

scute, *sc*, I, 0,0 + . Бесщетинковый. Скутеллярные и другие щетинки уменьшены в числе (1).

sepia, *se*, III, 26,0. Сепия. Коричневато-красный цвет глаз, темнеющий с возрастом (1).

sepiaoid, *sed*, III, 64,5 + . Сепиевидный. Шоколадный цвет глаз (3).

shaven, *sv*, IV, 0,1 + . Стриженный. Брюшные щетинки реже нормы (1).

short-wing, *sw*, I, 64,0. Короткокрылый. Крылья укорочены; глаза уменьшены, грубые. Оптимум 28° (2).

singed, *sn*, I, 21,0. Опаленный. Щетинки и волоски изогнуты (1).

small-bristle, *sbr*, I, 33,4. Уменьшенные щетинки, некоторые отсутствуют.

small-eye, *sy*, I, 59,2 + . Малоглазый. Глаза уменьшены, округлые (2).

small-wing, *si*, I, 53,5. Малокрылый. Крылья короткие, продолговатые, глаза увеличены (2).

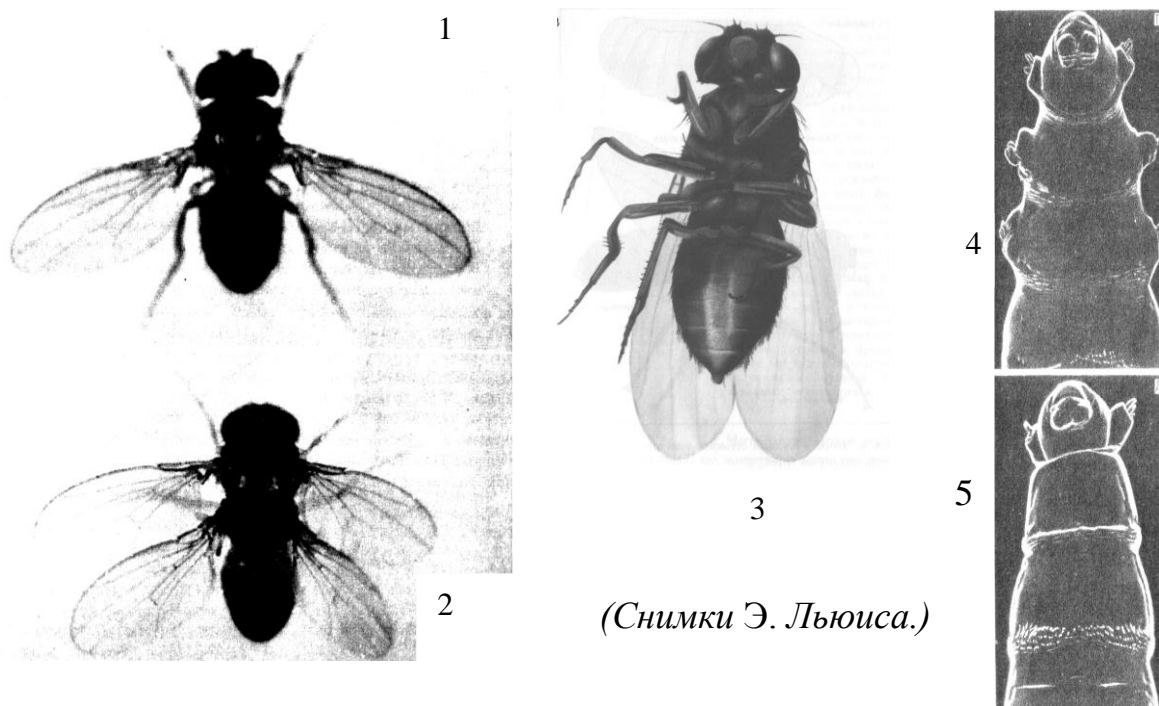
smooth, *sm*, II, 91,5. Гладкий. Брюшко без волосков. Стерильны (4).

sparkling, *spa*, IV, ? Глаза грубые, выпуклые. Оптимум 19° (5).

speck, sp, II, 107,0. Пятнистый. Черное пятнышко в основании крыла (1).
spineless, ss, III, 58,5. Бесщетиновый. Щетинки очень малы. Аллеломорф *aristapedia* (1).
split, spl, I, 2,9 + . Расщепленный. Глаза грубые, уменьшены, щетинки расщеплены (1).
Star, S, II, 1,3. Звездчатый. Глаза уменьшены, грубые. Гомозиготы летальны (1).
staroid, std, II, 56,5 +. Звездчатообразный. Глаза уменьшены, очень грубые. Самки стерильны (4).
Sternopleural, Sp, II, 22,0. Добавочные стерноплевральные щетинки. Гомозиготы летальны. Оптимум 29° (2).
straw, stw, 11,35,1. Соломенный. Тело, крылья, щетинки желтые (1).
Streak, Sk, II, 16,0. Полосатый. Центральная полоска на груди. Гомозиготы летальны (4).
stripe, sr, III, 62,0. Полосатый. Темная полоска по средней линии груди (1).
Stubble, Sb, III, 58,2. Остриженный. Щетинки короткие, толстые. Гомозиготы летальны (1).
tan, t, I, 27,5. Смуглый. Тело и антенны желтоватые (2).
telegraph, tg, II, 0,0 + . Телеграф. Продольная жилка прервана (4).
tetraptera, ttr, III, 51,3. Жужжальцеобразные крылья (4).
thick, tk, II, 55,3. Утолщенные ножки, глазки увеличены, крылья короткие (2).
thread, th, III, 43,2. Нитевидный. Аристы нитевидные, неветвящиеся (1).
tilt, tt, III, 40,0. Наклоненные крылья растопырены и искривлены, III продольная жилка прервана (2).
tiny, ty, 44,5. Щетинки и тело уменьшены. Самки стерильны (2).
Truncate, T, II, 13,0. Обрезанные крылья. Аллеломорф *dumpy*. Гомозиготы летальны (1).
uneven, un, I, 54,4. Неровная поверхн. глаз. Глаза грубые, уменьшены (1).
upward, upw, II, 62,0 + . Приподнятые крылья (5).
veinlet, ve, III, 0,2. Укороченные продольные жилки (1).
vermilion, v, I, 33,0. Киноварный цвет глаз, глазки бесцветны (1).
vestigial, vg, II, 67,0. Зачаточнокрылый. Крылья и жужжальца зачаточные (1).
wavy, wy, I, 41,9. Волнистый. Крылья волнообр. искривлены и загнуты (2).
warped, юр, III, 47,5 +. Искривленные крылья растопырены, приподняты, бесцветны (2).
white, w, I, 1,5. Белоглазый. Глаза белые, глазки, мальпигиевы сосуды и семенники бесцветны (1).
white ocelli, wo, III, 76,2. Бесцветные глазки (2).
Wrinkled, W, III, 46,0. Морщинистый. Крылья не вполне расправлены (1).
yellow, y, I, 0,0. Желтый цвет тела; ротовой аппарат личинки коричневый (1).

ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИКИ РАННЕГО ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ И ГОМЕОБОКСА

На протяжении XIX в. эмбриологи подробно изучили у большинства живых существ те изменения, которые приводят к развитию оплодотворенной яйцеклетки, размножение и дифференцировку клеток, построение органов и частей тела. Все эти изменения, управляемые программой развития, разворачиваются в строго определенном порядке в пространстве и времени.



(Снимки Э. Льюиса.)

Рис.3. 1. Гомеотические мутации дрозофилы: на месте одного органа формируется другой (снимки Э. Льюиса)

(1). Нормальная особь дрозофилы с одной парой крыльев и тремя парами ног; позади крыльев видна пара небольших гантелевидных образований жужжалец.

(2). Мутантная особь с двумя парами крыльев. Вторая пара крыльев образовалась у этого насекомого из жужжалец вследствие двух мутаций мутации *bithorax*, *bx*, приводящей к превращению в крылья передней части жужжалец, и мутации *postbithorax*, *pbx*, вызывающей развитие крыльев из задней части жужжалец (у этой мухи имеется

еще одна мутация, стимулирующая превращение жужжалец в крылья). (3). Особь дрозофилы с мутацией *Ultrabithorax*, *Ubx*, приводящей к формированию четырех полных пар ног. (4). Личинка дрозофилы с мутацией *Ultrabithorax*, *Ubx* (такие насекомые не доживают до взрослого состояния). У таких личинок в отличие от нормальных (5), в передней части имеется не одна, а три пары боковых придатков. Эти придатки представляют собой органы, несущие дыхательные отверстия, или дыхальца. У нормальной личинки они расположены лишь во втором грудном сегменте, а у личинки с мутацией *Ultrabithorax*, *Ubx* еще и в третьем грудном и первом брюшном сегментах. Мутация *Ubx* приводит к тому, что третий грудной и первый брюшной сегменты приобретают черты сходства со вторым грудным. (Снимки Э. Льюиса.)

С помощью методов молекулярной генетики развития дрозофилы удалось добиться значительного прогресса. Исследование некоторых мутаций дрозофилы позволило приблизиться к пониманию генетической регуляции развития. Особый интерес в этом отношении представляют *гомеотические мутации*, при которых на месте одного органа формируется другой. Развитие организма животного начинается с того, что оплодотворенная яйцеклетка делится на две клетки, затем образуется 4, 8 клеток и далее, до тех пор, пока не сформируется бластула, шарообразная структура из нескольких тысяч клеток. Далее клетки продолжают делиться, но одновременно происходит их дифференцировка: постепенное изменение строения и метаболической активности. В процессе дифференцировки одни клетки становятся эпидермальными, другие — нервными, мышечными, костными, клетками кишечника. У насекомых (дрозофила) происходит еще один процесс, приводящий к формированию эмбриона, — *образование сегментов*. Эти сегменты хорошо видны у взрослой мухи, брюшной отдел которой имеет кольчатое строение.

Сегментом называется каждое из таких колец. Эмбриологами было показано, что сегменты взрослой особи соответствуют сегментам эмбриона. Так, уже на ранних стадиях развития можно различить клетки, из которых в дальнейшем произойдут три сегмента грудного отдела и восемь сегментов брюшного отдела взрослой мухи (рис. 1.7.1, раздел 1.7). У взрослой особи в области первого грудного сегмента располагается пара ног, в области второго — пара ног и пара крыльев, в области третьего — пара ног и пара жужжалец (небольших образований в форме гантелей, представляющих собой рудиментарные крылья и служащих для уравнивания тела мухи в полете). В превращении недифференцированного эмбрионального сегмента в грудной сегмент, несущий характерные органы, участвуют механизмы клеточной дифференцировки и морфогенеза (образования частей тела). Для объяснения этих механизмов А. Гарсиа-Беллидо с сотрудниками (Мадридский университет) и П. Лоуренс с сотрудниками (лаборатория молекулярной биологии, Кембридж, Великобритания) предложили следующую гипотезу: можно упрощенно считать, что из клеток каждого сегмента эмбриона будут развиваться клетки соответствующего сегмента взрослой особи. В пределах каждого сегмента происходит размножение и диффе-

ренцировка эмбриональных клеток: так, во втором грудном сегменте некоторые клетки приобретают черты, характерные для тканей крыла, и организуются, образуя крылья; другие клетки дифференцируются в клетки ног и образуют ноги. Каким образом клетки «узнают», что они должны приобрести черты, характерные для тканей крыла, но не жужжальца и образовывать именно крыло? Можно предположить, что их «судьба» зависит от их расположения в эмбрионе. Одни клетки, расположенные во втором грудном сегменте эмбриона, сформируют ткани крыла, другие, локализующиеся в третьем грудном сегменте эмбриона,— ткани жужжалец. В соответствии с этим клетки должны каким-то образом «распознавать» свое положение в эмбрионе и, исходя из информации об этом положении, изменять свою обменную активность и налаживать определенные связи с соседними клетками. Все клетки многоклеточного организма (насекомого, млекопитающего, моллюска и т. д.) обладают тем же генотипом, что и оплодотворенная яйцеклетка. Однако поскольку в той или иной клетке начинают протекать определенные обменные процессы, и она превращается в клетку крыла, а не жужжальца, развитие определяется лишь частью информации, содержащейся в генотипе. Если проводить аналогию с информационными процессами, то генотип можно представить в виде программы, т. е. набора инструкций. Каждая клетка обладает этой программой целиком, однако в зависимости от положения этой клетки она выполняет лишь часть инструкций. Каким образом программа развития того или иного организма заложена в его генотипе. Все клетки организма обладают сходным генотипом, однако каждая из них подчиняется лишь определенным инструкциям. Как осуществляется «выбор» этих инструкций в той или иной клетке. Первые шаги к разрешению этого вопроса были сделаны при помощи исследований некоторых мутаций, приводящих к изменению процессов развития дрозофилы (*гомеотические мутации*).

В результате таких мутаций на месте какого-либо органа образуется другой орган, расположенный в норме в ином месте. Так, при мутации *Antennapedia* у мух на голове вместо антенн формируются ножки. Первое сообщение о гомеотических мутациях, затрагивающих данную область тела дрозофилы, было сделано в 1927 г. К. Бриджесом. Речь шла о мутации *bithorax*, *bх*, в результате которой передняя часть первого брюшного сегмента приобретает черты третьего грудного сегмента. У таких мутантных мушек четыре пары ног вместо трех (рис. 1, 3). В 1941 г. К.Б. Бриджес (США) выделил мутантных дрозофил и дал им название *bithorax*, *bх*. У этих мух передние части жужжалец заменены тканями крыла. При дальнейшем исследовании было обнаружено, что передняя половина третьего грудного сегмента у них превращена в переднюю половину второго грудного сегмента. В частности, передние части третьей пары ног обладают чертами, характерными для второй пары ног. Таким образом, у мутантов *bх* вместо части третьего сегмента в процессе развития образова-

лась гомологичная часть второго сегмента. В 1954 г. другой американский генетик, Э. Льюис обнаружил еще один тип мутантов, названный им *postbithorax*, *pbx*. У этих мутантов задняя часть жужжалец, ног и всего третьего сегмента в целом обладает чертами, свойственными второму сегменту. При скрещивании мух *bithorax*, *bх* и *postbithorax*, *pbx* можно получить дрозифил, обладающих одновременно обеими мутациями. Эффект мутаций суммируется, и вместо третьего сегмента образуется второй. У таких мух две пары крыльев (рис. 1,2) - *четырекрылые мухи*. Существует также мутация *Ultrabithorax*, *Ubx*, при которой третий грудной и первый брюшной сегменты обладают чертами, характерными для второго грудного сегмента (мухи с такой мутацией не доживают до состояния взрослой особи), поэтому сходство третьего грудного и первого брюшного сегментов со вторым грудным сегментом можно наблюдать лишь у личинки (рис. 1.4). Наличие таких мутаций свидетельствует о возможности замены одних сегментов или частей сегментов другими. Возникает впечатление о существовании некоторого исходного плана строения сегментов и о том, что его модификации в процессе построения организма могут приводить к возникновению других сегментов путем изменения направления развития клеток. Во втором грудном сегменте это направление приводит к формированию крыльев, в третьем — жужжалец. Если это последнее направление не реализуется, то клетки развиваются так, как если бы они находились во втором сегменте, т. е. образуют крылья. На более глубоком уровне существования передающихся по наследству гомеотических мутаций, изменяющих программу развития тех или иных структур дрозифилы, свидетельствует о наличии подобных инструкций в генотипе. Иными словами, гомеотические мутации служат доказательством существования генов, определяющих судьбы клеток, — генов-селекторов по терминологии А. Гарсиа-Беллидо. Изучение наследственной передачи гомеотических мутаций, которое проводил в последние годы Э. Льюис, показало, что *гены-селекторы*, с которыми, по-видимому, связаны мутации типа *bithorax*, *postbithorax* и другие, расположены в хромосоме № 3 дрозифилы. Эти гены собраны в небольшом участке данной хромосомы, образуя так называемый *генетический комплекс*. Рассматриваемая группа генов получила название *комплекса bithorax*. В результате 30-летних исследований этого комплекса Э. Льюис выдвинул гипотезу, объясняющую управление со стороны *генов-селекторов* этого комплекса развитием клеток сегментов, расположенных позади второго грудного (Э. Льюис, 1987). В сегментах, расположенных впереди второго грудного, т. е. в первом грудном и сегментах головы, действуют другие гены-селекторы, принадлежащие к *комплексу Antennapedia*. Расположение сегментов на разных этапах развития *Drosophila melanogaster* представлено на рис 1.7.3. раздела 1.7. Исходное предположение Э. Льюиса (см. выше) заключалось в том, что строение второго грудного сегмента является «основой» для строения всех остальных сегментов. Сег-

менты, расположенные «позади» от второго грудного, развились в результате постепенных модификаций, обусловленных включением генов-селекторов. Второй грудной сегмент формируется лишь в том случае, когда гены комплекса *bithorax* «выключены» во всех клетках этого сегмента. Третий грудной сегмент образуется в результате включения в определенных клетках этого сегмента гена-селектора; это приводит к тому, что из одних клеток строятся передние части жужжалец, а из других — передние части ног. Именно этот ген повреждается при мутации *bithorax*. Нормальное состояние этого гена принято обозначать *bh+*, а мутантное (неактивное) — *bh*. Эффект мутации *bithorax* объясняется тем, что в результате повреждения гена *bh+* определенные клетки не могут формировать передние части жужжалец и ног третьего сегмента. В связи с этим их развитие идет по тому пути, по которому оно шло бы во втором сегменте: образуются передние части крыльев и ног второго сегмента. При выключении в третьем сегменте гена *bh+* возникает такая же картина, как и во втором сегменте, где этот ген неактивен в нормальных условиях. Другой ген-селектор, также действующий в третьем грудном сегменте, направляет развитие клеток таким образом, что из них образуются задние части жужжалец и ног. Этот ген повреждается при мутации *postbithorax*, и поэтому его нормальное состояние обозначают *pbx+*, а мутантное — *pbx*. В первом брюшном сегменте кроме генов *bh+* и *pbx+*, (активных уже в предшествующем сегменте) действует еще один ген-селектор, препятствующий формированию лапок и жужжалец. Этот ген, обозначаемый *bxd+*, повреждается при мутации *bithoraxoid* (при этом он обозначается *bxd*). Согласно модели Льюиса, аналогичные механизмы действуют во всех брюшных сегментах вплоть до восьмого: по мере удаления от грудного отдела последовательно «включаются» все новые гены комплекса *bithorax* (брюшные сегменты, не несущие никаких придатков, незначительно отличаются друг от друга морфологически). Возникает вопрос: не обусловлена ли и мутация *Ultrabithorax*, *Ubx* повреждением определенного гена? Особенности строения личинки при этой мутации таковы, как если бы были выключены гены *bh+*, *pbx+* и *bxd+*. Таким образом, мутация *Ubx* действительно соответствует одновременному повреждению этих трех генов. Э. Льюис отметил, что его модель не только объясняет определенные процессы развития, но ее основные положения сами могут быть объяснены с позиций эволюции видов, предшествующих отряду двукрылых. Действительно, эволюция членистоногих (группы, к которой принадлежат ракообразные, паукообразные и насекомые), приведшая к появлению насекомых и, в частности, двукрылых, по-видимому, шла в следующем направлении: тела первых членистоногих состояли из множества одинаковых сегментов (наподобие сороконожек). У приходящих им на смену организмов эти сегменты постепенно дифференцировались. Очевидно, такая дифференцировка была обусловлена появлением все новых генов-селекторов, приводящих к морфологической диффе-

ренцировке каждого сегмента. Первые крылатые насекомые обладали четырьмя парами крыльев (примером могут служить стрекозы). Эволюция этих крылатых насекомых также была связана с дифференцировкой сегментов, происходящей под влиянием новых генов-селекторов. Отсюда следует, что двукрылые насекомые являются более поздним продуктом эволюции, чем четырехкрылые. Повреждение в результате мутаций новых генов приводит к тому, что в морфологии двукрылых насекомых появляются древние черты четырехкрылые.

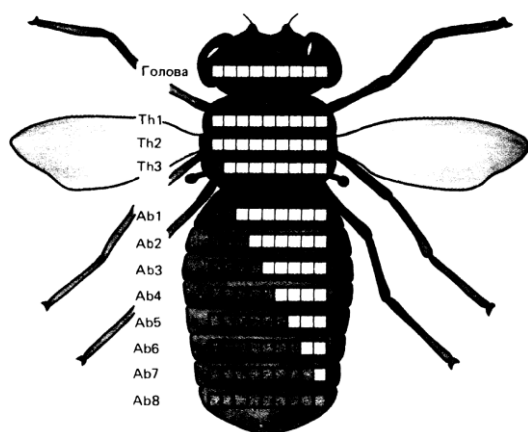


Рис.3.2. Модель, Э. Льюиса, объясняющая управление постепенной дифференцировкой сегментов дрозофилы в процессе развития.

На рисунке, представлены наборы генов-селекторов различных сегментов (каждый квадратик соответствует одному или, в исключительных случаях, двум таким генам)

Клетки каждого из сегментов подчиняются определенным генетическим инструкциям (сигналам) генов, локализованных в хромосомах. Выбор инструкций, характерных для каждого сегмента, из общего набора (генотипа) происходит под влиянием *генов-селекторов*. Строение второго грудного сегмента (*Th2*), несущего пару крыльев с дорсальной стороны и пару ног—с вентральной, представляет собой исходный вариант морфологии всех остальных сегментов. Такой вариант формируется в том случае, если все гены-селекторы выключены (на схеме - незакрашенные квадратики). В третьем грудном сегменте (*Th3*) такие гены активизируются (*закрашен первый квадратик*), что приводит к построению из клеток не крыльев, а жужжалец. Эти гены-селекторы соответствуют генам *bх* и *rbх*. В следующем сегменте (первом брюшном) дополнительно включается еще один ген-селектор. Это приводит к подавлению сигналов, управляющих формированием ног и жужжалец. Так, вплоть до последнего брюшного сегмента постепенно происходит морфологическая дифференцировка последующего сегмента от предыдущего. Это связано с вовлечением все новых генов-селекторов. Такая *модель генетической регуляции* развития дрозофилы была создана на основании исследований *гомеотических мутаций*. Гипотеза активно проверяется на уровне биохимической активности генов. К концу 70-х гг. XX века прочно утвердились представления о *генах-селекторах*, регулирующих развитие дрозофилы. К этому времени появились методы генной инженерии, позволяющие исследовать гены и их деятельность на уровне ДНК. В 1983 г. группа исследователей из лаборатории Д. Хогнесса (Станфордский университет) при помощи методов генной инженерии вы-

дела ДНК, соответствующую генам комплекса *bithorax*. Прежде всего, выделяли соответствующий этому комплексу участок хромосомной ДНК, затем определили расположение в этом участке генов *bh+*, *pbx+* и *bxd+*. Для выделения из ДНК комплекса *bithorax* потребовалось применить новый метод генной инженерии — «продвижение вдоль хромосомы». В первых работах с использованием методов генной инженерии (1976 г.) было необходимо выделить определенный ген из десятков тысяч генов, входящих в состав генотипа высшего организма (дрозофилы или мыши), приходилось ограничиваться лишь выделением генов, обладающих очень высокой активностью в определенных клетках. Так, ген глобина мыши очень активен в клетках-предшественниках эритроцитов. В связи с этим в данных клетках обнаруживается большое количество глобиновой информационной РНК. Методами генной инженерии, ставшими уже классическими, такие фрагменты «вживляют» бактериям-рецепторам и в дальнейшем выводят клоны этих бактерий. Задача состоит в том, чтобы, пользуясь молекулярным зондом, отыскать клон, содержащий тот фрагмент хромосомной ДНК, к которому относится искомый ген. Однако данный метод невозможно было применить для изучения ДНК комплекса *bithorax* дрозифилы, так как в распоряжении генетиков нет информационных РНК, соответствующих этому комплексу. Исследования продвинулись после того, как У. Бендер и П. Синерэ (1978) разработали метод «продвижения вдоль хромосомы», позволивший выделять и клонировать определенные гены дрозифилы, информационная РНК которых не была выделена. Метод «продвижения вдоль хромосомы» состоит в том, чтобы «дойти» по хромосоме от какого-либо гена, уже имеющегося в бактериальных клонах, до расположенного поблизости исследуемого гена (или комплекса генов). Ген из бактериального клона можно использовать в качестве исходного «зонда» для отбора других генов, содержащих более или менее длинные фрагменты ДНК исследуемого животного. При этом находят фрагмент, окончание которого расположено в хромосоме ближе всего к искомому гену. Это окончание выделяют и используют в качестве нового «зонда». В процессе исследований были получены неожиданные результаты. Оказалось, что гены *Ubx +* и *bxd +* необычайно велики: первый состоит из 70 тысяч пар оснований, а второй из 20 тысяч. Кроме того, ген *bh +* расположен внутри гена *Ubx +*, а ген *pbx +* внутри гена *bxd +*. Важнейшее значение имеет тот факт, что различные *мРНК*, формируются из длинной молекулы-предшественника, причем та или иная разновидность *мРНК* определяется входящими в ее состав экзонами.

Благодаря новым методам исследования (лаборатория В. Геринга, Базель), основные положения модели Льюиса были подтверждены. В процессе изучения комплекса *Antennapedia*, в частности в лаборатории Т. Кауфмана (1983, Университет штата Индиана), было показано, что этот комплекс играет в передних отделах тела дрозифилы ту же роль, что и ком-

plex bithorax в задних его отделах. Молекулярный анализ этих двух комплексов (1983, Базель), выявил у них наличие и других общих черт. Так, одна из РНК, соответствующих комплексу *Antennapedia*, формируется в процессе созревания предшественника, состоящего из более, чем 100 тысяч пар оснований. Таким образом, в данном случае различные мРНК также могут соответствовать одной и той же области ДНК, но образовываться в результате различных процессов созревания. Изучение генных комплексов *Antennapedia* поставило на повестку дня новые представления о гене. Согласно классической формулировке, ген представляет собой последовательность нуклеотидов ДНК, управляющую синтезом белка посредством РНК. Эту формулировку кратко выражают так: «ген - мРНК - белок». В ходе созревания пре-мРНК интроны вырезаются, а экзоны сохраняются. Наряду с этими механизмами может существовать еще один тип регуляции, контролирующей сплайсинг экзонов. Подобная регуляция может направлять процессы созревания по разным путям и тем самым управлять синтезом той или иной мРНК в определенных тканях на определенных этапах развития этих организмов является то, что все они в процессе эмбрионального развития проходят стадию сегментации. У круглого червя *S. elegans* (эти животные в процессе эмбриогенеза не проходят стадию сегментации) эта последовательность не была найдена. Означает ли наличие гомеобоксов у позвоночных, что их развитие, по крайней мере, на определенной стадии, управляется «гомеотическими» генами? В пользу такого предположения свидетельствуют данные, полученные в совместных исследованиях группы В. Геринга и Э. де Робертиса (Базель). Согласно этим данным, на тех стадиях развития лягушки, когда можно предполагать активацию гомеотического гена, включается ген, в состав которого входит гомеобокс. Исходя из этого, можно предположить наличие гомеотических мутаций у позвоночных. Не исключено, что такие мутации имеют место у мышей с добавочной парой ребер на шейных позвонках (в норме ребра расположены лишь на грудных позвонках). Именно позвонки формируются в процессе сегментации эмбриона млекопитающих. Можно ли из этого сделать выводы, что формирование организма млекопитающего (и человека) сходно с построением организма дрозофилы? Возможно, в развитии млекопитающего участвуют и иные механизмы. Современные достижения позволяют надеяться, что в недалеком будущем будут получены новые данные о молекулярной регуляции генов развития млекопитающих.

Библиографический список

1. Алиханян, С. И. Общая генетика / С. И. Алиханян, А. П. Акифьев, Л. С. Чернин. – М. : Высшая школа, 1985. – 448 с.
2. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях / Ю.П. Алтухов. М.: «Академкнига», 2003. – 431 с.
3. Айала, Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику / Ф. Айала. – М. : «Мир», 1984. – 232 с.
4. Айала, Ф. Современная генетика / Ф. Айала, Д.В. Кайгер // Собр. соч. : в 3 т. – М. : «Мир», 1988. – Т.3. – С. 32 - 69.
5. Богданов, Ю.Ф. Изменчивость и эволюция мейоза / Ю.Ф. Богданов // Генетика. - 2003. – Т. 39. - № 4. - С.453-473.
6. Ватти, К.В. Руководство к практическим занятиям по генетике. Пособие для студентов биол. фак. пед. ин-тов. 2 изд. / К.В. Ватти, М.М. Тихомирова. – М. : «Просвещение», 1979 – 189 с.
7. Генетика: сб. ст. / под ред. А.А. Жученко. – М. : «КолосС», 2003. – С. 419-467.
8. Гершензон, С.М. Основы современной генетики / С.М. Гершензон. – Киев : «Наукова думка», 1983. – С. 135- 240.
9. Гершензон, С.М. Мутации / С.М. Гершензон. – Киев. : «Наукова думка», 1991. – 111 с.
10. Гершкович, И. Генетика / И. Гершкович. Пер. В.А. Гвоздева, Ю.И. Зографа и др. : под ред. Н.И. Шапиро. – М. : «Наука», 1968. – 699 с..
11. Генетика и наследственность : сб. ст. / под ред. С. Г. Васецкого ; пер. с франц. А.В. Акуличева, А.А. Алипова. М. : «Мир», 1987. – С. 277-296.
12. Генетические последствия загрязнения окружающей среды : сб. ст. / под ред. Н.П. Дубинина. – М. : «Наука», 1977. – С. 38- 153. .
13. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях : сб. ст. / под ред. Ю. П. Алтухова. – М. : «Наука», 2004. – 619 с.
14. Дубинин, Н.П. Генетика популяций и селекция / Н.П. Дубинин, Я.Л. Глембоцкий. – М., 1967. – 592 с.
15. Дубинин, Н.П. Общая генетика / Н.П. Дубинин. – М. : «Наука», 1986. – 559 с.
16. Жимулёв И.Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск : «Наука», 1992. – С. 306-308.
17. Жимулёв, И.Ф. Действие генов в раннем развитии дрозофилы / И.Ф. Жимулёв // Сорос. образов. журнал. – 1998. – №7. – С. 30-34.
18. Жимулёв, И.Ф. Генетическая детерминированность поведения дрозофилы и человека / И.Ф. Жимулёв // Сорос. образов. журнал. - 1997. - №1. - С. 22-25.
19. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулёв. Отв. ред. Беляева Е.С., Акифьев А.П. – Новосибирск : изд. НГУ, 2002. - 458с.

20. Жимулёв, И.Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск : «Наука», 1992. – С. 306-308.
21. Жученко, А.А. Генетика / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский и др. : сб. ст. / под ред. А.А. Жученко. – М. : «КолосС», 2003. – 480 с.
22. Захаров, И.А. Генетические карты высших организмов / И.А. Захаров. – Л. : «Наука», 1979. – 157 с.
23. Инге-Вечтомов, С.Г. Генетика с основами селекции / С.Г. Инге-Вечтомов. – М. : «Высшая школа», 1989. – 582 с.
24. Картель, И.А. Генетика: энциклопедический словарь. Картель И.А., Макеева Е.Н. Мезенко А.М / Минск. Технология, 1999.
25. Кикнадзе, И.И. Функциональная организация хромосом / И.И. Кикнадзе. Отв. ред. Соколов И.И. – Л. : «Наука», 1972. – 212 с.
26. Корочкин, Л.И. Введение в генетику развития / Л.И. Корочкин. – М. : «Наука», 1999. – С. 75-120, 210 – 229.
27. Козак, М.Ф. Биометрия / М.Ф. Козак. – Астрахань: изд-во «Волга», 1996. – 164 с.
28. Козак, М.Ф. Методы решения генетических задач / М.Ф. Козак. - Астрахань : изд-во «Волга», 1984. – 54 с.
29. Козак, М.Ф. Генетика (с основами селекции). Планы семинаров и коллоквиумов / М.Ф. Козак. - Астрахань : изд. дом «Астраханский университет», 2006. – 15 с.
30. Кушев, В.В. Механизмы генетической рекомбинации / В.В. Кушев. – Л. : «Наука», 1971. – 247 с.
31. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М. : «Высшая школа», 1990. – 352 с.
32. Лобашев, М.Е. Генетика / М.Е. Лобашев. – Л. : изд-во ЛГУ, 1967. – С. 285-415.
33. Лобашев, М.Е. Генетика с основами селекции / М.Е. Лобашев, К.Т. Ватти, М.М. Тихомирова. – М. : «Просвещение», 1979. – 304 с.
34. Льюин, Б. Гены / Б. Льюин. – М. : «Мир», 1986. – С. 413 -432. .
35. Медведев, Н.Н. Практическая генетика / Н.Н. Медведев. – М. : «Наука», 1968. – 294 с.
36. Мендель, Г.Н. Опыты над растительными гибридами / Г.Н. Мендель. – Москва. Петроград : гос. изд-во, 1923. – 72 с.
37. Морган, Т.Г. Развитие и наследственность / Т.Г. Морган ; пер. Ю.Я. Керкиса. – Москва. Ленинград. : гос. изд. биол. и мед. литературы, 1937. – 242 с.
38. Мюнтцинг, А. Генетика. Общая и прикладная / А. Мюнтцинг ; пер. Н.Л. Глембоцкого [и др.]. – М. : «Мир», 1967. – 410 с.
39. Озернюк, Н.Д. Механизмы адаптаций / Н.Д. Озернюк. – М. : «Наука», 1992. – 272 с.

40. Озернюк, Н.Д. Анализ механизмов адаптационных процессов / Н.Д. Озернюк, С.К. Нечаев // Изв. РАН. – Серия биология. – 2002. - №4. - С. 457-462.
41. Омельчук, Л.В. Основные события клеточного цикла, их регуляция и организация / Л.В. Омельчук, С.А. Трунова, Л.И. Лебедева, С.А. Фёдорова // Генетика. - Т.40. - 2004. - №3. - С. 293-310.
42. Орлова, Н.Н. Генетический анализ / Н.Н. Орлова : учеб. пособие. - М. : изд-во МГУ, 1991. - 318 с.
43. Пианка, Э. Эволюционная экология / Э. Пианка; пер. с англ. - М. : «Мир», 1981. – 400 с.
44. Плохинский, Н.И. Математические методы в биологии / Н.И. Плохинский. - М. : изд-во МГУ, 1978. – 265 с.
45. Плохинский, Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. - М. : изд-во МГУ, 1970. – 365 с.
46. Плохинский, Н.А. Математические методы в биологии / Н.А. Плохинский. - М. : изд-во МГУ. 1978. – 265 с.
47. Ратнер, В.А. Математическая популяционная генетика / В.А. Ратнер. – Новосибирск : «Наука», 1977. – 126 с.
48. Ригер, Р. Генетический и цитогенетический словарь / Р. Ригер, А. Михаэлис ; пер. с нем. Бочкова Н.Н. – М. : «Колос», 1967. – 607 с.
49. Рэфф, Р.А. Эмбрионы. Гены и эволюция / Р.А. Рэфф, Т.Г. Коффмен ; пер. с англ. – М. : «Мир», 1986. – С. 52 – 209..
50. Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле : сб. ст. / под. ред. В.В. Хвостовой [и др.]. – Новосибирск : «Наука», 1977. – С. 5 – 99.
51. Серебровский, А.С. Генетический анализ / А.С. Серебровский. – М. : «Наука», 1970. – 342 с.
52. Смирнов, В.Г. Цитогенетика / В.Г. Смирнов. – М.: «Высшая Школа», 1991. – С. 42 -197, 146 - 194.
53. Тихомирова, М.М. Генетический анализ / М.М. Тихомирова. - Л. : изд-во Ленингр. ун-та, 1990. – 280 с.
54. Финчем, Дж. Генетическая комплементация / Дж. Финчем. – М. : «Мир», 1968. – 183 с.
55. Хедрик, Ф. Генетика популяций / Ф. Хедрик ; пер. с англ. Лушниковой Н.Н., Петровой А.В. – М. : «Техносфера», 2003. – 588с.
56. Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – Изд. 4. – М. :ИКП. «Академкнига», 2004 . – 495 с.
57. Чиркова, Э.Н. Волновая природа регуляции генной активности. Живая клетка как фотонная вычислительная машина / Э.Н. Чиркова // Успехи современной биологии. – 1994. – Т.114. – Вып. 6. – С. 659-692.
58. Шварц, С.С. Эволюционная экология животных / С.С. Шварц. – Свердловск, 1969. – 200 с.
59. Шварц, С.С. Экологические закономерности эволюции / С.С. Шварц. – М. : «Наука», 1980. – С. 280.

- 60.Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов : уч.-справоч. пособие. – Новосибирск, 2004. – Изд. 2. – 496 с.
- 61.Энциклопедия современного естествознания / гл. ред. В.Н Сойфер. – М. изд. дом «Магистр-Пресс», 2002. – Т. 2. 8, 10.
- 62.Ashburner M. *Drosophila. A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989. P. 912.
- 63.D Robertis E., Oliver G., Wright C. Homeobox genes and the vertebrate body plan // *Sci. Amer.* 1990. Vol. 263. P. 26-33.
- 64.Gehring W. J. Master control genes in development and evolution: the homeobox story. New Haven: London: Yale University Press, 1998. P. 180-209.
- 65.Gehring W. J. The Homeobox: a key to the understanding of development? *Cell*. 40. jan. 1985.
- 66.Gehring W. J. The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye // *Genes to Cells*. 1996. Vol. 1. P. 11-15
- 67.Haider G., Callaerts P., Gehring W. J. Induction of entopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila* I! *Science*. 1995a. Vol. 267. P. 1788-1792.'
- 68.Haider G. Callaerts P., Gehring W. J. New per species on eye evolution It *Current Opin. Genet. Developm.* 1995b. Vol. 5. P. 602-609.
- 69.Judd B. H, Shen M. W., Kaufman T. C The anatomy and function of a segment of the chromosome of *Drosophila melanogaster*//*Genetics*. 1972. Vol. 71. P. 139-156.
- 70.Lawrence P. A. The making of a fly. The genetics of animal design. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992. 232 p.
- 71.Lefevre G. Salivary chromosome bands and the frequency of crossing over in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 1971. Vol. 67. P. 497-513.
- 72.Lewis, E. B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila* / E. B. Lewis // *Nature*. 1978. Vol. 276. P. 565-570.
- 73.Lindsley D.L., Zimm G.G. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego; New York; Boston; 1992. 1133 p.
- 74.O'Brien S. Genetic maps. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982. Vol. 2. 405 p.
- 75.Painter T. J. Salivary chromosomes and the attack on the gene // *Hereditas*. 1934. Vol. 25. P. 465-476.
- 76.Russell P. *Genetics*. 5th ed. Menlo Park, California: Addison Wesley Longman Inc. 1998. P. 569-579.
77. Zhimulev I.F. Fine cytological analysis of the band 10A1-2 and the adjoining regions in the *Drosophila melanogaster* × chromosome. II. Genetical analysis / Zhimulev I.F., Pokholkova G. V., Bogatov A.V., Semeshin V.F., Belyaeva E.S. // *Chromosoma*. 1981. Vol. 82. P. 25-40.

Маргарита Федоровна КОЗАК

**ДРОЗОФИЛА –
МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ГЕНЕТИКИ**

Учебно-методическое пособие

*Редактирование, компьютерная правка
Е.А. Хлебниковой*

Заказ № 1251. Тираж 200 экз.
Усл. печ. л. 5,0. Уч.-изд. л. 5,4

Издательский дом «Астраханский университет»
414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 20
тел./факс (8512) 54-01-89, тел. (8512) 54-01-87, e-mail: asupress@yandex.ru