

летальных доз оксианионів вольфрама або ванадія. Припущена наявність у геномі сої локусів, підвищена нестабільність яких обумовлена дією різних стресових факторів.

Using lethal dose of oxyanions W or V the same RAPD-amplicons that are differentially synthesized from DNAs of tungsten-resistant cell line as well as their wild culture of soybean (*Glycine max* L., Merr.) are shown. The presence of instable loci in genome of soybean under different stressors are under discuss.

ФЕДОРОВА Н.Б., ЧАДОВА Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. акад. Лаврентьева, 10, тел.(383)333 2976,

e-mail:bonife@bionet.nsc.ru

МУТАЦИЯ В ОНТОГЕНЕ ДРОЗОФИЛЫ ВЫЗЫВАЕТ ПЕРЕМЕЩЕНИЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНА 412

Генетическая нестабильность (ГН) – картина, характерная для ряда явлений: канцерогенеза, гибридного дисгенеза, отдаленных последствий облучения. Несмотря на очевидную общность характера ГН и связь явлений между собой, до сих пор ГН рассматривается в каждой из этих трех областей изолированно. В общем случае под ГН понимают «длительное сохранение отклонений в строении и функционировании генетического аппарата, ДНК - белкового комплекса» [1]. ГН выражается в длительном образовании с высокой частотой точковых мутаций, хромосомных перестроек, канцерогенезе, анеуплоидии, хронической гибели части клеток в культурах *in vitro*.

Механизмы индукции и поддержания ГН дискутируются. В случае облучения причины возникновения ГН связывают с прямым повреждением ДНК и продуктов цитоплазмы. Одной из причин ГН при канцерогенезе предполагается анеуплоидия [2]. Феноменология ГН связана с увеличением транспозиционной активности мобильных генетических элементов (МЭ). Для канцерогенеза это - мобилизация ретровирусных элементов, для гибридного дисгенеза - систем МГЭ типа Р-М и I-R [3]. Облучение тоже является индуктором транспозиционной активности МГЭ. Под действием облучения скорости инсерций увеличиваются более чем на порядок величин [4].

Ранее нами был обнаружен новый класс мутаций – мутации генов, управляющих онтогенезом (онтогены) [5, 6]. Формально генетически это - факультативные доминантные летальные мутации (ФДЛ). Их факультативность (условность) заключается в том, что у особей одного генотипа они проявляют летальное действие, у особей другого генотипа – не проявляют. Перестройки способны снимать летальное действие ФДЛ [7], сохраняя тем самым мутации в популяции. Мутация в онтогене может сохраниться и в том случае, если она возникнет в уже перестроенном геноме. Последующая дестабилизация генома связана с массовыми перемещениями МЭ и феноменологически схожа с картиной дисгенеза.

Материалы и методы

Линии *Drosophila melanogaster*. Для получения мутаций была использованы линии дикого типа - *Berlin wild* и *Barnaul* и изогенная линия 51 с мутацией *radius incompletus, ri* (III; 47сМ). Для ведения в культурах и выявления свойств мутаций использовали линии: 1) *yellow (y)*; 2) *C(1)DX, y w f /Y*; 3) *Muller-5* и 5) *net dp b pr cn/In(2LR)Cy, Cy dp^{lv1} pr Bl cn² L⁴*.

Получение мутаций (ФДЛ). Для получения мутаций в X-хромосоме самцов дрозофилы *Berlin wild* и изогенной линии 51 облучали γ -лучами в дозе 30 Gr. Через три часа их скрещивали с самками *C(1)DX, y w f /Y*, несущими сцепленные X-хромосомы,

свободную Y-хромосому и цепочку маркеров. Тестирование на наличие ФДЛ проводили путем индивидуального скрещивания полученных сыновей с самками линии *yellow*. Признаком наличия ФДЛ является отсутствие самок в их потомстве. В каждом из опытов анализировали потомство от 3 тысяч индивидуальных скрещиваний.

Поддержание культур. Мутации в X-хромосоме содержали двумя способами: на сцепленных X-хромосомах *C(1)DX*, *y w f/Y*, или на комплексной инверсии *Muller-5*.

Образование диморфных линий. При переводе мутаций в X-хромосоме – 7 и 18 из культур со сцепленными X-хромосомами в культуры с *Muller-5* возникли особи с новым фенотипом: мутантный фенотип имели самки, самцы внешне были нормальны.

Для исследования транспозиционной активности МЭ 412 у мутантов исследовали локализацию 412 элемента в двух диморфных линиях с ФДЛ - 7 и №18, в изогенной линии 51 и в контрольной линии 3С. Линии 7, 18 и 3С были получены на основе исходной линии 51, самцы из которой были взяты для облучения. Линии 7 и 18 по результатам тестирования содержали ФДЛ, а линия 3С, пройдя все этапы получения, не проявила признаков наличия ФДЛ.

Гибридизация. Для локализации сайтов, содержащих копии МЭ 412 применяли FISH-гибридизацию меченого зонда с полнотелыми хромосомами слюнных желез дрозофилы. В линиях исследовали выборки из 10 личинок, анализируя в среднем по 25 ядер на препарат. В качестве зонда использовали ДНК клона pOR708, несущего полноразмерную копию 412 элемента в составе вектора pBR322. Мечение зонда проводили методом НИК-трансляции.

Для оценки статистической достоверности транспозиционных эффектов – инсерций и эксцизий применили критерий Фишера для редких событий.

Результаты и обсуждение

Феноменология дестабилизации генома

Коллекция лаборатории на данный момент насчитывает более 100 мутаций онтогенов в X-хромосоме и аутосомах. Дальнейшее изучение ФДЛ показало, что мутации приводят к дестабилизации генома [8, 9], феноменология которой кратко изложена ниже.

«Разлеталивание». Мутации поддерживали двумя способами - в культурах с инверсией *In(1) Muller-5* и на сцепленных X - хромосомах. Потеря летального действия мутаций была обнаружена через год после получения мутаций: самцы из нескольких культур в скрещивании с самками *yellow* стали давать дочерей. За 4 года из 23 летальных мутаций 9 мутаций полностью потеряли летальность, а 5 перешли в разряд полеталей [9].

Потеря проявления доминантной мутации в оппозиционной хромосоме.

Летальные мутации в аутосоме 2, поддерживающиеся в гетерозиготе с инвертированной хромосомой *In(2LR)Cy*, *Cy Bl L⁴*, характеризуются «потерей» проявления доминантных мутаций *Cy*, *Bl* и *L⁴* в инвертированной хромосоме. Потеря происходила в скрещиваниях при поддержании мутаций и в скрещиваниях между мутантными культурами. За полгода поддержания мутаций было замечено 20 случаев потери проявления: в 17 случаях произошла потеря одного маркера, в 3 случаях – двух [9].

Хромосомная нестабильность. В потомстве самок - гетерозигот по инверсии *Muller-5* и мутации в X-хромосоме с самцами *yellow* возникает большое количество патроклинных самцов *yellow*: они находились в потомстве 20 мутаций из 21, причем у 11 мутаций доля патроклинных самцов была очень высокой - более 10% потомства. Образование патроклинных самцов свидетельствует о потере X-хромосомы во время образования ооцита или о мейотическом нерасхождении X-хромосом [10]. Исследование других мутаций онтогенов показало, что в оогенезе мутантов происходят оба процесса [8].

Единичные и массовые модификации. В культурах мутаций появляются волны *фенокопий*. В одном или нескольких поколениях воспроизводится тот или иной фенотип известных мутаций: *black, purple, brown, trident, abnormal abdomen, Notch, yellow, Dichaete* и др. Попытка закрепить новый фенотип в отводке оказывается безуспешной [9].

Массовое образование морфозов. Выщепление новых фенотипов в культурах мутаций онтогенов происходит на фоне образования разнообразных односторонних морфологических дефектов клонального типа - морфозов [6, 8, 9]. Они не наследуются, но наследование мутаций онтогенов обеспечивает образование морфозов в каждом поколении культур. По частоте встречаемости в культурах морфозы намного превосходят мутации и модификации.

Образование видимых мутаций. В процессе поддержания культур с ФДЛ среди особей нормального фенотипа возникают особи, соответствующие фенотипам известных мутаций. Изменения фенотипа наследуются, причем мутации могут иметь полную и неполную пенетрантность. Так, в культурах возникли мутации с полной пенетрантностью типа *plexus, dumpy, brown* и с неполной - *cubitus interruptus, radius incompletus, black*. Фенотипически проявляющиеся мутации образовывались и целыми наборами в одном или в следующих друг за другом поколениях [9].

Перемещение МЭ 412 в диморфных линиях

Среди мутаций онтогенов в X – хромосоме, полученных на основе изогенной линии № 51, были получены две мутации с видимым фенотипическим проявлением: «коротконожка» (7) и «прерванная жилка» (18). Мутации были рецессивными и диморфными: самки имели мутантный фенотип, а самцы были фенотипически нормальны [12]. Фенотип мутации 18 представлен прерыванием радиальной жилки крыла, а фенотип мутации 7 («коротконожка») складывается из четырех компонентов: 1) отсутствия четырех члеников лапок на каждой ноге; 2) косо срезанных крыльев; 3) прерывании радиальной жилки на крыльях и 4) образовании пузырей на одном или двух крыльях.

Исследовали уровни транспозиционной активности мобильного элемента (МЭ) 412 в линиях 7, 18 и контрольной линии 3с. Линия 3с была получена в ходе того же эксперимента, в котором были получены 7 и 18 линии, но не содержала ФДЛ. Она была использована для оценки увеличения частот транспозиций, вносимого процедурой выведения линий.

Согласно критерию Фишера (F_{ϕ}), ни по инсерциям, ни по эксцизиям линия 3С не отличается от исходной 51 линии. Это означает, что сама методика получения линий с ФДЛ не показала значимых отличий от контроля (табл. 1).

Таблица 1

Числа инсерционных (новых) и эксцизионных (утраченных) позиций МЭ 412 при изогенизации линии *forked* и в диморфных линиях с ФДЛ

Исследованные линии	Изогенизация (контроль – гетерог.)		Исследованные линии (контроль - 51)			Исследованные линии (контроль - 3С)	
	3	5	3 С	7	18	7	18
Число новых позиций	15***	11**	7	15**	6	13***	5
Число утраченных позиций	3	5	2	5	13**	12**	17***
Всего позиций в линии	48	42	50	64	49	64	49

Примечание. Достоверные отличия по Фишеру (F_{ϕ}): ** $P > 0,99$, *** $P > 0,999$.

Диморфные линии достоверно отличаются от 51 контрольной линии: 7 линия - по инсерциям, а 18 – по эксцизиям. При этом частоты инсерций и эксцизий находятся на уровне частот при изогенизации (левая часть табл. 1), наиболее мощном из известных индукторов перемещений МЭ [11].

Более высокие частоты инсерций 412 элемента в 7 линии и частоты эксцизий в 18 линии в сравнении с линией 3С (контроль – изогенная линия 51) дают возможность предполагать, что видимая и генетически выявленная нестабильность генома в диморфных линиях присутствует и на молекулярном уровне. Сравнение транспозиционной активности МЭ 412 7 и 18 линий с уровнем 3С (правая часть табл. 1) дает возможность оценить генетическое своеобразие линий, несущих ФДЛ. Линия 7 достоверно отлична от 3С и по инсерциям, и по эксцизиям, а линия 18 – по эксцизионной активности элемента.

Выводы

Полученные данные о высоких частотах перемещения МЭ 412 согласуются с генетическими свидетельствами нестабильности линий с мутациями в онтогенах. Мутацию в онтогене можно рассматривать как ключевое событие, переводящее геном из стабильного состояния в нестабильное. Образование ФДЛ, а затем комплекса «доминантная леталь + перестройка», по нашему мнению, является наиболее перспективным для последующего видообразования [12]. Становление нового вида будет связано с переустройством его регуляторной системы, что на генетическом уровне обеспечивается массовыми перемещениями МЭ генома.

Литература

1. *Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А.* Радиобиология человека и животных. Москва: Высшая школа, 2004. 550 с.
2. *Duesberg P., Rausch C., Rasnick D., Hehlmann R.* Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Nov (10), 95 (23). P. 13692-13697.
3. *Хесин Р.Б.* Непостоянство генома. Москва: Наука. 1985. 472 с.
4. *Забанов С.А., Васильева Л.А., Ратнер В.А.* Индукция транспозиций МЭ Dm 412 при помощи γ – облучения в изогенной линии *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1995. Т. 31. № 6. С. 798-803.
5. *Чадов Б.Ф., Чадова Н.Б., Копыл С.А., Федорова Н.Б.* Новый класс мутаций у *Drosophila melanogaster* // Докл. РАН. 2000. Т. 373. №5. С. 714-717.
6. *Чадов Б.Ф.* Факультативные доминантные летали: генетика, онтогенез и филогенез // Эволюционная биология: Материалы II конф. "Проблема вида и видообразования" / Под ред. В.Н. Стегния. Томск: Томский государственный ун-т. 2002. Т. 2. С. 118-142.
7. *Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Хоцкина Е.А., Артёмова Е.В., Федорова Н.Б.* Главное действие хромосомной перестройки – изменение работы регуляторных генов. Генетика. 2004. Т. 40. № 7. С.723-731.
8. *Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Копыл С.А., Хоцкина Е.А., Федорова Н.Б.* Гены, управляющие онтогенезом: морфозы, фенкопии, диморфы и другие видимые проявления мутантных генов // Генетика. 2004. Т.40. № 3. С. 353-365.
9. *Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Хоцкина Е.А., Федорова Н.Б.* Мутация в онтогене – дестабилизация генома – формообразование. В кн. «Эволюционная биология» (под ред. В.Н. Стегния) г. Томск : Томский государственный университет. 2005. Т.3. С. 92-106.
10. *Bridges C.B.* Nondisjunction as proof of the chromosome theory of heredity // Genetics. V.1. P.1-52, 107-162.
11. *Ратнер В.А., Васильева Л.А.* Индукция транспозиций и эксцизий мобильных генетических элементов у дрозофилы в процессе изогенизации // Генетика. 1996. Т.32. № 7. С.933-944.
12. *Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Копыл С.А., Артёмова Е.В., Хоцкина Е.А., Федорова Н.Б.* От генетики внутривидовых отличий к генетике внутривидового сходства // Генетика. 2004. Т.40. № 9. С.1157-1172.

Резюме

Факультативные доминантные летали (ФДЛ) являются мутациями регуляторных генов, управляющих онтогенезом (онтогенов). Линии, содержащие ФДЛ, демонстрируют высокую нестабильность. В двух диморфных линиях с ФДЛ обнаружили множественные перемещения ретротранспозона 412. Считаем, что мутация в онтогене является ключевым событием, переводящим генотип из стабильного состояния в нестабильное.

ЧУМАЧЕНКО А.Г., МЯЗИН А.Е., РАМАЙЯ Л.К., ПОМЕРАНЦЕВА М.Д., ШАЙХАЕВ Г.О., РУБАНОВИЧ А.В.

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН, Москва.

E-mail: a_chumachenko@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ НА ТРАНСГЕНЕРАЦИОННУЮ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ RAPD-МАРКЕРОВ ПОТОМКОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C

Одним из факторов экспериментальной и естественной микроэволюции является воздействие ионизирующих излучений, как природного, так и техногенного происхождения. Поэтому, актуальной проблемой радиационной генетики, на разрешение которой направлены многие современные исследования, является изучение эффектов воздействия ионизирующих излучений, передающихся по наследству от облученных родителей потомству. Значительная часть таких исследований посвящена изучению явления геномной нестабильности (НСГ)[1-4]. При этом большое внимание уделяется возникновению полиморфизма в высоковариабельных микро- и минисателлитных локусах, для которых было показано повышение частоты мутаций вследствие воздействия физических и химических факторов, в первую очередь – ионизирующей радиации.

В данной работе была поставлена задача исследовать генетический эффект облучения в дозе 3 Гр, проявляющийся у потомков облученных мышей, с использованием оценки полиморфизма RAPD-маркеров (random amplified polymorphic DNA). К настоящему времени опубликован ряд работ, в которых с помощью RAPD-теста, были обнаружены радиационно-индуцированные эффекты, передающиеся потомкам облученных мышей и человека [5, 6, 7].

Материалы и методы

RAPD-анализ основан на использовании серии случайных праймеров. Электрофореграммы продуктов такой амплификации дают картину, специфичную для данного генома, так называемые ДНК-фингерпринты, «отпечатки пальцев ДНК». При этом предварительное секвенирование генома данного организма не требуется. Это позволяет широко применять данный метод для филогенетических исследований, для стандартизации пород, линий, сортов и штаммов. Следовательно, RAPD-анализ является ценным методом для радиационно-генетического мониторинга, поскольку дает возможность мультилокусного «сканирования» гипервариабельных локусов в геноме практических любых организмов, являющихся объектами мониторинга. Минусом является низкая воспроизводимость электрофореграмм, связанная с высокой чувствительностью метода к изменению параметров амплификации и состава реакционной смеси. Большое значение имеет стабильность работы полимеразы и количество матричной ДНК. То есть, требуется предварительная отработка условий, с целью стандартизации реакции.

Мышей-самцов линии BALB/c облучили в дозе 3 Гр на установке ГУПОС-1 (4,5 Гр/мин, ¹³⁷Cs). Через три месяца после облучения, самцов скрестили с самками той же