

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА СПОНТАННЫХ ДОМИНАНТНЫХ ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНОМЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Ю.Н. Иванов

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: iyn@bionet.nsc.ru

Описан метод определения количества спонтанных доминантных летальных мутаций (ДЛМ) в геноме плодовой мушки *Drosophila melanogaster* по выживанию зигот. Оценка среднего числа спонтанных ДЛМ в полном геноме (аутосомы + X-хромосома) равна $0,0224 \pm 0,0057$. ДЛМ составляют примерно 2/3 всех спонтанных мутаций, возникающих в геноме, а смертность от ДЛМ составляет около 4 % от всех зигот.

Ключевые слова: *D. melanogaster*, доминантные летальные мутации (ДЛМ), выживание зигот, регуляторное значение мутационного процесса, смертность зигот от ДЛМ.

Введение

Доминантной летальной мутацией (ДЛМ) называется любая вновь возникшая мутация, которая вызывает гибель зиготы немедленно, в первом же поколении (Hadorn, 1961; Ivanov, 1998a). Любая, в том числе рецессивная летальная (РЛМ) или даже видимая (ВМ), мутация в силу отрицательного влияния на жизнеспособность может вызвать немедленную гибель зиготы, и в таком случае она регистрируется как ДЛМ (Ivanov, 1998b). Если же мутация сначала выживает, а вызывает гибель потом, в последующих поколениях, то ее уже нельзя считать ДЛМ, хотя бы она проявила летальное действие в гетерозиготе: вызванная ею гибель будет уже относиться к случайной смертности. Именно так понимаются ДЛМ, о которых пойдет речь в работе. Трудность определения количества ДЛМ состоит в том, что нельзя разделить непосредственно гибель зигот от ДЛМ и случайную смертность: это можно сделать только путем специальной организации опыта. Работа содержит описание такого опыта и его результаты при решении данной проблемы на *Drosophila melanogaster*.

Материал и методика

Для устранения помех, привносимых случайной смертностью, был применен следующий метод. При одинаковых условиях в популяции Кантон-С подсчитывалось выживание зигот на стадии от яйца до имаго: 1) без облучения и 2) при облучении самцов-родителей γ -лучами, так что один геном каждой зиготы был облучен для повышения частоты ДЛМ. Для определения степени ее повышения у тех же самых самцов-родителей методом Меллер-5 ($M5 = \text{Basc}$) определялась частота возникновения мутаций в X-хромосоме: 1) без облучения и 2) при облучении. Согласно допущению, число ДЛМ в облученном геноме возросло так же, как число мутаций в X-хромосоме, тогда как случайная смертность в вариантах (1) и (2) оставалась одинаковой, что и позволило исключить ее из уравнений для выживания делением одного на другое.

Пусть Q – доля зигот, выживших на стадии от яйца до имаго; u – частота возникновения РЛМ и ВМ в X-хромосоме; A – среднее число ДЛМ в полном геноме (аутосомы + X-хромосома) и a – среднее число РЛМ и ВМ, возникающих в X-хромосоме без облучения; \tilde{Q} , \tilde{u} , \tilde{A} и \tilde{a} – те же

величины, но при облучении самцов-родителей γ -лучами; R – частота гибели зигот от случайных причин (летальных генетических факторов, кроме ДЛМ, и неблагоприятных влияний среды); s – доля генов X-хромосомы во всем геноме и e – основание натуральных логарифмов.

Имеем следующие соотношения. Частота Q выживания зигот без облучения равна произведению вероятности того, что в зиготу не попадет ни одной ДЛМ, на вероятность того, что зигота не погибнет от случайных причин. Первая вероятность равна e^{-X} , где X есть среднее число ДЛМ в зиготе, т. е. параметр распределения Пуассона, которому подчиняется число ДЛМ в зиготе. Число полных геномов в зиготе самки равно 2, в зиготе самца $2 - s$, ибо самец вместо второй X-хромосомы содержит генетически пустую Y-хромосому. Тогда «средняя», «интерсексуальная» зигота при соотношении полов 1 : 1 содержит $2 - s/2$ полных генома, а среднее число ДЛМ в ней равно $X = A(2 - s/2)$. Отсюда первая вероятность равна $e^{-X} = e^{-A(2-s/2)}$. Вторая вероятность равна $1 - R$. Поэтому

$$Q = e^{-A(2-s/2)}(1 - R). \quad (1)$$

Аналогично находится выражение для частоты \tilde{Q} выживания зигот при облучении самцов-родителей, когда один из геномов зиготы оказывается облученным. Но теперь среднее число ДЛМ в «средней между полами» зиготе будет равно $\frac{(A + \tilde{A}) + [A + \tilde{A}(1 - s)]}{2} = A + \tilde{A}(1 - s/2)$, где в левой части первое слагаемое в числителе $(A + \tilde{A})$ – число ДЛМ в зиготе самки, а второе $[A + \tilde{A}(1 - s)]$ – число ДЛМ в зиготе самца. Вероятность того, что в «средней» зиготе не будет ни одной ДЛМ, равна $e^{-[A + \tilde{A}(1 - s/2)]}$, а искомое выражение будет

$$\tilde{Q} = e^{-[A + \tilde{A}(1 - s/2)]}(1 - R). \quad (2)$$

Частота u возникновения мутаций в X-хромосоме измеряется как вероятность хотя бы одной мутации в ней и равна дополнению до единицы вероятности того, что ни одной такой мутации не произойдет. Последняя вероятность находится из распределения Пуассона с параметром a и равна e^{-a} , откуда

$$u = 1 - e^{-a}. \quad (3)$$

Аналогично частота возникновения мутаций в X-хромосоме при облучении самцов-родителей равна

$$\tilde{u} = 1 - e^{-\tilde{a}}, \quad (4)$$

где \tilde{a} – параметр распределения Пуассона для числа мутаций, возникающих в X-хромосоме при облучении.

Еще одно уравнение есть допущение, что число ДЛМ в геноме пропорционально числу мутаций, возникающих в X-хромосоме:

$$\frac{A}{\tilde{A}} = \frac{a}{\tilde{a}}. \quad (5)$$

Уравнения (1)–(5) образуют систему с неизвестными $A, \tilde{A}, a, \tilde{a}$ и R , решая которую, находим выражение для среднего числа спонтанных ДЛМ в полном геноме:

$$A = \frac{\ln \frac{\tilde{Q}}{Q}}{(1 - s/2) \left[1 - \frac{\ln(1 - \tilde{u})}{\ln(1 - u)} \right]}.$$

Величины \tilde{Q}, Q, \tilde{u} и u получаются в независимых опытах, поэтому погрешность величины A находится по простой формуле, которую ради краткости можно дать в общем виде как оценку дисперсии функции нескольких независимых переменных:

$$s^2_f = D[f(x_1, x_2, \dots, x_n)] = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 s^2_{x_i},$$

где $\frac{\partial f}{\partial x_i}$ – значение частной производной функции f по x_i в точке $(\hat{x}_1, \hat{x}_2, \dots, \hat{x}_n)$; \hat{x}_i – опытное значение x_i и $s^2_{x_i}$ – оценка дисперсии величины \hat{x}_i (Вентцель, 1962).

Опыт проведен в двух повторностях. В каждой были взяты две группы самцов из лабораторной популяции Кантон-С: 1) необлученные и 2) облученные γ -лучами дозой 1500 Р. Те и другие были скрещены с самками дикого типа (+) из популяции Кантон-С и одновременно, в тех же пробирках, с самками линии M5 (Basc). В потомстве самок (+) определялось выживание зигот на стадии от яйца до имаго: Q в варианте (1) и \tilde{Q} в варианте (2). В скрещиваниях с самками M5 определялась частота возникновения мутаций в X-хромосоме спермиев: u в варианте (1) и \tilde{u} в варианте (2). Общий план опыта изображен на схеме.

Результаты

Результаты двух повторностей опыта представлены в табл. 1 и 2. В рубрике (а) приведены

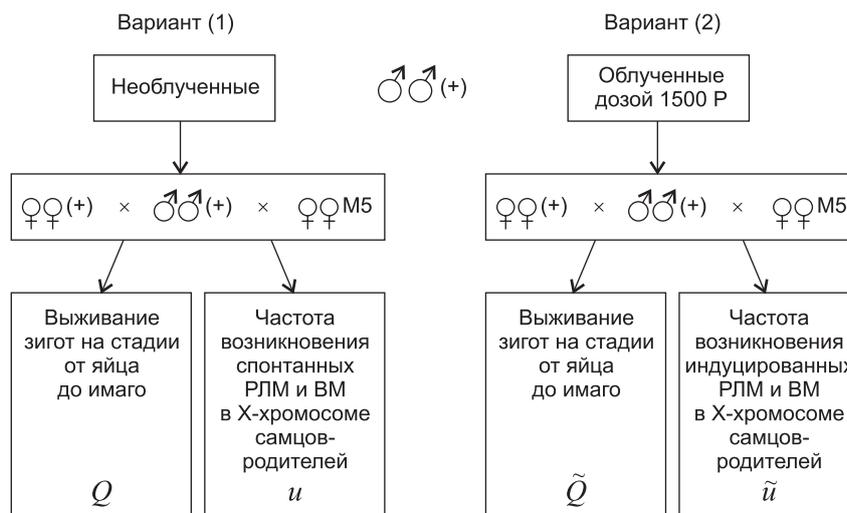


Схема опыта по определению количества ДЛМ в геноме *D. melanogaster*.

Таблица 1

Определение количества ДЛМ в полном геноме (аутосомы + X-хромосома) *Drosophila melanogaster* по выживанию зигот в потомстве облученных и необлученных самцов

а) Данные опыта

Условия опыта	Число яиц N	Число имаго n	Выживание n/N	Выживание при выровненных условиях плотности популяции $Q(104)$	Мутабельность в X-хромосоме самцов-родителей, % u	Объем выборки гамет
При облучении самцов-родителей	3198	2038	0,6373	$0,6374 \pm 0,0191$ $m = 25$	$3,197 \pm 0,504$	1220
Без облучения	3593	2925	0,8141	$0,8621 \pm 0,0154$ $m = 23$	$0,203 \pm 0,034$	17243

б) Вычисленные величины

Условия опыта	Среднее число РЛМ и ВМ в X-хромосоме a	Среднее число ДЛМ в геноме A	Случайная смертность R	Смертность зигот от ДЛМ
При облучении самцов-родителей	0,03249	$0,3559 \pm 0,0467$	0,1002	0,2913
Без облучения	0,00203	$0,0223 \pm 0,0062$		0,0415

Примечание. Первая повторность опыта. m – число культур.

измеренные, а в рубрике (б) – вычисленные величины. В первом опыте при измерении выживания на стадии от яйца до имаго оказалось, что доля выживших зигот Q или \tilde{Q} зависит от числа мух x , развившихся в стаканчике. При большом числе мух, т. е. при высокой плотности популяции, доля выживших существенно снижалась, и наоборот. Линейные приближения этой зависимости в вариантах (1) и (2) суть функции

1) $Q(x) = 0,9664 - 9,988 \cdot 10^{-4}x$;

2) $\tilde{Q}(x) = 0,7208 - 7,991 \cdot 10^{-4}x$.

Среднее число имаго в стаканчике в вариантах было 127,2 и 81,5 соответственно. Такое различие по плотности населения создавало и различие случайной смертности R . Однако эта помеха была устранена приведением выживания зигот в обоих вариантах к одной и той же плотности населения мух в культуре, а имен-

Таблица 2

Определение количества ДЛМ в полном геноме (аутосомы + X-хромосома)
D. melanogaster по выживанию зигот в потомстве облученных и необлученных самцов

а) Данные опыта

Условия опыта	Общее выживание n/N	Среднее выживание в культуре		Мутабельность в X-хромосоме самцов-родителей, % u	Объем выборки гамет
		Число культур m	$Q \pm \frac{s}{\sqrt{m}}$		
При облучении самцов-родителей	$\frac{791}{2730} = 0,2897$	30	$0,2630 \pm 0,0380$	$3,197 \pm 0,504$	1220
Без облучения	$\frac{1071}{2571} = 0,4166$	27	$0,3577 \pm 0,0446$	$0,203 \pm 0,034$	17243

б) Вычисленные величины

Условия опыта	Среднее число РЛМ и ВМ в X-хромосоме a	Среднее число ДЛМ в геноме A	Случайная смертность R	Смертность зигот от ДЛМ
При облучении самцов-родителей	0,03249	$0,3625 \pm 0,2250$	0,6265	0,2958
Без облучения	0,00203	$0,0227 \pm 0,0151$		0,0423

Примечание. Вторая повторность опыта. Обозначения те же, что в табл. 1.

но к среднему числу мух между вариантами $\frac{1}{2}(127,2 + 81,5) \approx 104$. Величины выживания $Q(104)$ и $\tilde{Q}(104)$ будут уже относиться к условиям одинаковой плотности населения, в которых случайная смертность R будет тоже одинаковой. Именно они и приведены в табл. 1 (а) как корректирующие величину выживания n/N , где N – общее число яиц, а n – число разившихся мух во всех культурах варианта.

Оценка доли s , которую составляют гены X-хромосомы во всем геноме, получена из данных, заимствованных в работах других авторов (Дубинин, 1966; Lindsley, Grell, 1968; Kavenoff, Zimm, 1973; Корочкина, 1977; Жимулев, 1993). Вычисленные величины в таблицах получены при $s = 0,19$.

Обсуждение

Осреднение результатов обеих повторностей опыта с весами, равными s_i^{-2} ($i = 1, 2$), дает среднее число спонтанных ДЛМ в полном геноме $A = 0,0224 \pm 0,0057$. Среднее число спонтанных РЛМ и ВМ, возникающих во всем геноме, вычисленное из среднего их числа в X-хро-

мосоме $a = 0,00203$ и ее доли в геноме $s = 0,19$, равно $0,0107$. Всего вместе с ДЛМ в геноме возникает в среднем $0,0107 + 0,0224 = 0,0331$ спонтанных мутаций, а доля ДЛМ среди них составляет 68 %. ДЛМ – самый многочисленный класс мутаций в спонтанном мутагенезе, и экологическое значение их очень велико. Выясняется, что мутационный процесс играет регуляторную роль в экосистеме, и ДЛМ являются в нем главным агентом смертности, ограничивающим плотность популяции вида (Ivanov, Ivannikov, 1997). ДЛМ являются важнейшим фактором эмбриональной смертности при индуцированном мутагенезе (Hadorn, 1961), поэтому особый интерес представляет частота гибели зигот от спонтанных ДЛМ. Как мы видели, среднее число спонтанных ДЛМ в «средней» зиготе при первичном соотношении полов 1 : 1 равно $A(2 - s/2)$, а доля зигот, не получивших ни одной ДЛМ, равна $e^{-A(2-s/2)}$. Доля зигот, погибших от ДЛМ, равна $1 - e^{-A(2-s/2)}$, что при $A = 0,0224$ и $s = 0,19$ дает величину 0,0418.

Переносим результаты, полученные для популяции Кантон-С, на другие популяции *D. melanogaster*, приходим к выводам:

1. Среднее число спонтанных ДЛМ в полном геноме (аутосомы + X-хромосома), вычисленное при допущении, что число их пропорционально числу возникающих рецессивных летальных и видимых мутаций, так что прирост числа ДЛМ также прямо пропорционален дозе γ -лучей, равно $(224 \pm 57) \cdot 10^{-4}$, что составляет примерно 2/3 всех возникающих в геноме мутаций.

2. Частота гибели зигот от спонтанных ДЛМ составляет около 4 %.

Литература

- Вентцель Е.С. Теория вероятностей. М.: Наука, 1962. С. 240–247.
- Дубинин Н.П. Эволюция популяций и радиация. М.: Атомиздат, 1966. 743 с.
- Жимулев И.Ф. Гетерохроматин и эффект положения гена. Новосибирск: Наука, 1993. 491 с.
- Корочкина Л.С. Морфология и некоторые функциональные характеристики хромосом рода *Drosophila* // Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле. Новосибирск: Наука, 1977. С. 112–151.
- Hadorn E. Developmental Genetics and Lethal Factors. London: Methuen and Co Ltd; N.Y.: John Wiley and Sons, Inc., 1961. XVIII + 355 p.
- Ivanov Yu.N. Estimation of the number of spontaneous dominant lethal mutations in the genome of *D. melanogaster* // *Drosophila Inform. Serv.* 1998a. V. 81. P. 193–197.
- Ivanov Yu.N. Estimation of the number of genic dominant lethal mutations in the genome of fruit fly *D. melanogaster* using ethylmethane sulphate // *Drosophila Inform. Serv.* 1998b. V. 81. P. 186–193.
- Ivanov Yu.N., Ivannikov A.V. Difference in mutation rates between flies of small and large body sizes in natural *D. melanogaster* populations and regulatory meaning of this phenomenon // *Drosophila Inform. Serv.* 1997. V. 80. P. 57–59.
- Kavenoff R., Zimm B.H. Chromosoma sized DNA molecules from *Drosophila* // *Chromosoma*. 1973. V. 41. P. 1–27.
- Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic Variations of *D. melanogaster* // *Carnegie Inst. Wash. Public.* 1968. N 627. 472 p.

ESTIMATION OF THE NUMBER OF SPONTANEOUS DOMINANT LETHAL MUTATIONS IN THE GENOME OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Yu.N. Ivanov

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: iyn@bionet.nsc.ru

Summary

A method of estimation of the number of spontaneous dominant lethal mutations (DLM) in the genome of the fruit fly *Drosophila melanogaster* on the base of zygote survival is described. The mean number of spontaneous DLM in the whole genome (autosomes + X chromosome) is estimated to be $(224 \pm 57) \cdot 10^{-4}$. DLM constitute about 2/3 of all spontaneous mutations arising in the genome, and the zygote mortality from DLM is about 4 %.

Key words: *D. melanogaster*, dominant lethal mutations (DLM), survival of zygotes, regulatory significance of the mutation process, mortality of zygotes from DLM.