

黑腹果蝇紫眼卷翅遗传规律的研究

李红伟¹ 连林生² 赵春江¹ 白丽华¹ 邓学梅¹ 吴常信¹

(1. 中国农业大学 动物科学技术学院, 北京 100094; 2. 云南农业大学 动物科技学院, 昆明 650201)

摘要 为研究本实验室在紫眼野生型黑腹果蝇中发现的卷翅突变体遗传规律和分子基础,通过观察紫眼卷翅与野生型、紫眼卷翅与红眼卷翅后代各性状的表现规律,设计 14 对引物检测了 *syt* 基因与 *Alp23B* 基因间 DNA 多态性。结果表明: 1) 在紫眼卷翅与野生型杂交的 F_1 中,卷翅与野生型的比例为 1:1; 2) 紫眼卷翅与野生型杂交 F_1 代卷翅个体自交的 F_2 中,紫眼与红眼、卷翅与野生型正常翅 2 对性状符合孟德尔自由分离与组合定律; 3) 紫眼卷翅与红眼卷翅杂交的 F_1 中,卷翅与野生型的比例为 2:1; 4) 2 种卷翅品系中在 *syt* 与 *Alp23B* 之间的基因组区域存在 1 个多态位点; 2 种卷翅个体均为 AB 型,而野生型个体为无缺失的 AA 型; 紫眼卷翅与红眼卷翅杂交 F_1 中卷翅个体全为 AB 型。紫眼卷翅突变体为显性杂合子,平衡致死系;紫眼基因与卷翅基因不连锁;2 个卷翅基因为等位基因,相互间不能互补,杂合状态下致死。

关键词 黑腹果蝇; 卷翅突变体; 遗传杂交

中图分类号 Q 969.462.1; Q 31

文章编号 1007-4333(2006)05-0008-05

文献标识码 A

Study on genetics of curly wing in *Drosophila melanogaster*

Li Hongwei¹, Lian Lingsheng², Zhao Chunjiang¹, Bai Lihua¹, Deng Xuemei¹, Wu Changxin¹

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract To determine the genetics of curly wing in a curly mutant with purple eyes (C1) which was first found in purple flies, various cross combinations between C1 and wild-type and C1 and another curly mutant with red eyes (C2,) were studied. Fourteen pairs of primers were designed to detect differences between two curly mutants and wild type at the DNA level. The results showed that: 1) for test mating using C1 crossed with the wild type, either reciprocal cross yielded an F_1 invariably showing a 1:1 ratio of curly and wild. 2) self-cross of F_1 curly individuals from the cross between C1 and the wild type showed that phenotypic combinations of curly wing and wild type and purple and red eyes were according to the Mendelian law. 3) for test mating using C1 crossed with C2, either reciprocal cross yielded an F_1 invariably showing a 2:1 ratio of curly and wild. Flies from two different curly strains had genotype AB, but those from wild type strain had AA. This study provided evidences that Curliness is a dominant heterozygous character and the curly gene is not linked to the purple gene in C1. Two genes for curliness in C1 and C2 are alleles whose trans-heterozygote is lethal. These evidences could be very helpful in identifying a molecular mechanism of curly phenotype in a further study.

Key words *Drosophila melanogaster*; Cy mutation; genetic cross

卷翅(curly, 简称 Cy)是在果蝇中较早发现的突变体之一^[1],是遗传杂交中最常用的 2 号染色体上显性翅膀标记。1923 年,Lenore 通过遗传杂交实验在红眼卷翅中最早对卷翅性状的遗传规律进行

系统研究,证实卷翅突变体是平衡致死系即杂合子存活,纯合子致死^[2]。 Cy 基因在细胞学上的位置,先后被定位在 23A2-B2^[3]、23B3-B8^[4]、23 B1-B2 and 23C^[5],没有一个比较明确的结果,而 Cy 染色

收稿日期: 2006-04-17

作者简介: 李红伟,博士研究生, E-mail:lhwei2003@tom.com; 吴常信,中国科学院院士,教授,通讯作者,主要从事动物分子数量遗传学研究, E-mail:chxwu@public.bta.net.cn; 连林生,教授,通讯作者,主要从事动物分子数量遗传学研究, E-mail:lls401@sohu.com

体上的重排情况较为复杂, Lindsley 等研究报道分离到没有明显重排的 *Cy* 染色体^[6],但在 Littleton 等报道的分离到 6 条染色体中,有 4 条 *Cy* 染色体没有明显的重排,有 1 条在 23 B1-B2 处存在 1 个断裂点,而在另一条染色体上,除在 23 B1-B2 处存在 1 个断裂点外,还存在其他一些复杂的重排^[5]。目前,还没有对 *Cy* 基因在 DNA 水平上的研究报道。紫眼卷翅果蝇是中国农业大学动物科技学院果蝇实验室在紫眼果蝇中发现,通过紫眼卷翅雄蝇与紫眼残翅雌蝇杂交,在后代中挑选紫眼卷翅雌蝇,采用全同胞、半同胞、非同胞等不同亲缘程度的交配,经 20 多个世代的繁育培育而成的纯系^[7]。本研究旨在了解紫眼卷翅的遗传规律,通过遗传杂交实验和分子生物学实验,验证紫眼卷翅与红眼卷翅 2 个卷翅品系中的 *Cy* 基因是否为等位基因,为研究 *Cy* 基因的分子特征提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 果蝇品系

果蝇实验材料来源、特征见表 1;在 25℃ 恒温箱中培养,所有遗传杂交试验在 25℃ 完成。

表 1 果蝇品系特征

Table 1 Phenotypic expression and source of strain in *Drosophila melanogaster*

品系	表型特征	材料来源
紫眼卷翅	紫眼;翅膀向上翻卷,不能飞行	中国农业大学
红眼卷翅	红眼;从翅膀顶端部向上卷,与紫眼卷翅相比卷的程度小,不能飞行	北京大学
野生型	红眼;长翅,能飞行	中国农业大学

1.2 实验方法

1) 遗传杂交试验方法。参照刘祖洞等^[8]方法。杂交组合见表 2。

表 2 杂交组合配伍

Table 2 Cross combinations in experiment

第 1 阶段的杂交组合	第 2 阶段的杂交组合
紫眼或红眼卷翅 × 野生型	紫眼卷翅 × 野生型的 F ₁ 个体自交
紫眼卷翅 × 野生型的 F ₁	紫眼卷翅 × 红眼卷翅
红眼卷翅个体自交	

2) 分子实验方法。总 DNA 提取的方法和步骤按照果蝇实验指南^[9],除特别注明外,DNA 全部从

新鲜的个体成蝇提取,提好的 DNA 放在 -20℃ 保存。PCR 扩增的条件是:预变性 94℃ 4 min;94℃ 变性 30 s,复性(通过梯度 PCR 仪确定每对引物的最佳的复性温度)30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 7 min。其他分子生物学方法参照分子克隆实验指南^[10]。

1.3 统计分析

对计算实际观察值与理论观察值进行 χ^2 检验^[11]。

2 结果与分析

2.1 遗传杂交结果分析

2.1.1 紫眼卷翅与野生型杂交结果分析 在 F₁ 中紫眼卷翅与野生型杂交组合,卷翅个体数(219,雄 107,雌 112)与野生型个体数(251)的比例为 1:1,同时 F₁ 代卷翅个体中雌雄的比例也为 1:1,表明卷翅性状与性别无关。紫眼卷翅与野生型的杂交 F₁ 代中无论是卷翅或野生型个体,眼睛颜色全为红色,说明红眼对紫眼是显性。

在 F₁ 代中同时出现卷翅与野生型,而不是卷翅或野生型中的一种,表明紫眼卷翅个体是显性杂合子,但在紫眼卷翅品系在自繁过程中,始终能保持卷翅表型,而不出现野生型(图 1)。其主要原因:1) 一因多效,卷翅基因(*Cy*)对于果蝇翅膀来说是显性的,而对于果蝇的存活力来说它是隐性致死基因,所以它的纯合子是致死的,类似于在鼠中已报道的黄色基因^[12];2) 卷翅基因所在染色体对应的另一条染色体上也存在 1 个隐性致死基因(*lethal*),它的纯合子不能存活,只有它与卷翅基因(*Cy*)杂合时后代才能存活,即紫眼卷翅突变体是一个平衡致死系,杂合子存活,纯合子致死,所以紫眼卷翅个体虽为杂合子但在自繁过程,卷翅群体上下代个体的表型一致。

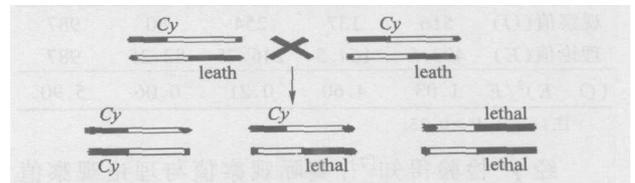


图 1 平衡致死示意图

Fig. 1 Schematic balanced lethal in curly strain

2.1.2 紫眼卷翅与野生型杂交 F₁ 自交结果分析 从表 3 可知, F₁ 卷翅个体自交产生的 F₂ 代卷翅野生型为 2:1。F₁ 野生型自交产生的 F₂ 代个体全为野生型,这与理论分析一致,但 F₁ 卷翅自交产生的 F₂ 的结果与理论分析不一致, F₂ 个体中卷翅野

表3 紫眼卷翅 × 野生型杂交 F₁ 代卷翅个体自交的 χ^2 检验结果

Table 3 Chi-square test in self-cross of F₁ curly flies from cross of curly flies with purple eyes and wild type

项目	卷翅个体数	野生型个体数	合计
观察值(O)	330	145	475
理论值(E)	316.66	158.34	475
$(O - E)^2 / E$	0.56	1.12	1.68 $\chi^2 = 1.68 (P > 0.1)$

注: $n = 1, P > 0.05$.

野生型为 2 : 1, 而不是 3 : 1, 说明 AA 型个体不能存活, 即卷翅基因的纯合子是致死的(图 2), 与图 1 相符。

假设卷翅的基因型为 Aa, 野生型的基因型为 aa, F₁ 自交结果如下:

上面结果与分析表明卷翅对野生型是显性, 红

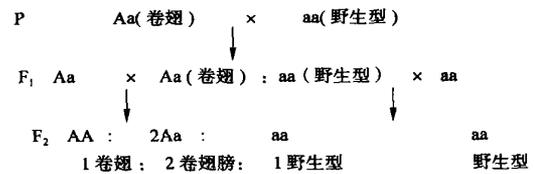


图2 紫眼卷翅与野生型杂交 F₁ 自交图

Fig. 2 Schematic self-cross of F₁ offspring from the cross of curly and wild type

眼对紫眼是显性, AA 型个体不能存活的即卷翅基因的纯合子是致死的。设卷翅为 A, 则野生型为 a; 红眼为 B, 则紫眼为 b, 那么亲本紫眼卷翅的基因型为 Aabb, 野生型为 aaBB, 则紫眼卷翅与野生型杂交的 F₁ 代个体中卷翅个体的基因型 AaBb, F₁ 红眼卷翅(AaBb) 自交, F₂ 代个体可能的基因型见表 4。

表4 F₁ 红眼卷翅(AaBb) 自交的 F₂ 代个体的基因型

Table 4 Genotypes of F₂ offspring from self-cross of F₁ curly flies of curly and wild type

合子	配子			
	AB	Ab	Ab	ab
AB	AABB- 致死	AABb- 致死	AaBB- 红眼卷翅	AaBb- 红眼卷翅
Ab	AABb- 致死	AAbb- 致死	AaBb- 红眼卷翅	Aabb- 紫眼卷翅
aB	AaBB- 红眼卷翅	AaBb- 红眼卷翅	aaBB- 红眼野生正常翅	aaBb- 红眼野生正常翅
Ab	AaBb- 红眼卷翅	Aabb- 紫眼卷翅	aaBb- 红眼野生正常翅	aabb- 紫眼野生正常翅

如果紫眼基因与卷翅基因不连锁, 那么根据孟德尔的自由组合定律^[7], 红眼卷翅 紫眼卷翅 红眼野生型正常翅 紫眼正常翅比例应为 6 : 2 : 3 : 1, 实际观察值与理论观察值分布见表 5。

表5 F₁ 红眼卷翅(AaBb) 自交的 χ^2 检验

Table 5 Chi-square test of the self-cross of F₁ offspring from cross of curly and wild type

项目	红眼卷翅	紫眼卷翅	红眼野生型	紫眼野生型	合计
观察值(O)	516	137	254	80	987
理论值(E)	493.5	164.5	246.75	82.25	987
$(O - E)^2 / E$	1.03	4.60	0.21	0.06	5.90

注: $n = 3, P > 0.25$.

经 χ^2 检验得知^[7], 实际观察值与理论观察值间差异不显著, 也就是说 4 种表型间的比例符合孟德尔的自由组合定律, 紫眼卷翅中控制紫眼的基因与控制卷翅的基因不连锁。

2.1.3 红眼卷翅与紫眼卷翅杂交结果分析 从理论分析来看, 因为在红眼和紫眼卷翅品系中, 卷翅基因所在染色体对应的同源染色体上存在隐性致死基因, 如果 2 个致死基因是同一位点($a_1 = a_2$), 那

么 2 个同一位点隐性基因就会纯合, 而纯合会致死, 所以不可能在杂交后代出现野生型(图 3); 如果 2 个致死基因不是同一位点($a_1 \neq a_2$), 那么 2 个隐性致死基因处于杂合状态, 它们的杂合子就会存活, 6 个卷翅品系杂交的后代中就会有野生型出现。本实验中红眼卷翅与紫眼卷翅杂交的 F₁ 中, 出现野生型(表 6), 属于后一种情况, 所以推断在紫眼或红眼卷翅品系中, 2 个卷翅基因所在染色体对应的同源染色体上存在的隐性致死基因可能不是同一位点。

表6 红眼卷翅与紫眼卷翅杂交 F₁ 的 χ^2 检验

Table 6 Chi-square test of offsprings from cross of two curly stocks

项目	卷翅个体数	野生型个体数	合计
观察值(O)	886	452	1338
理论值(E)	892	446	1338
$(O - E)^2 / E$	0.04	0.08	0.12 $\chi^2 = 0.12 (P > 0.25)$

注: $n = 1, P > 0.05$.

Littleton 等的研究报道中, 通过互补分析 Cy 的等位基因, 发现部分等位基因间能部分互补, 但有些等位基因间不能互补, 是致死的^[5]。因此, 在

红眼和紫眼卷翅品系中, 2 个卷翅基因组合, 可能出现的几种结果(图 3), 1) 如果 2 个卷翅基因为等位基因, 它们之间不能互补 ($A_1 = A_2$), 那么杂合型 A_1A_2 不能存活, 是致死的; 2) 如果 2 个卷翅基因为等位基因, 它们之间能互补 ($A_1 \neq A_2$), 那么杂合型 A_1A_2 能部分存活; 3) 如果 2 个卷翅基因不是等位基因 ($A_1 \neq A_2$), 那么杂合型 A_1A_2 能全部存活。在 1)、3) 情况下, 红眼卷翅与紫眼卷翅杂交的 F_1 中卷翅与野生型的比例应分别为 2:1 和 3:1。根据本实验结果, 在红眼卷翅与紫眼卷翅杂交的 F_1 代中, 经 χ^2 检验卷翅与野生型的比例符合 2:1(表 6), 2 个卷翅基因组合型符合第 1)、3) 种情况, 推断 2 个卷翅基因可能为等位基因, 它们之间不能互补 ($A_1 = A_2$), 其杂合型 A_1A_2 不能存活, 是致死的。这需要在分子水平上进一步验证。

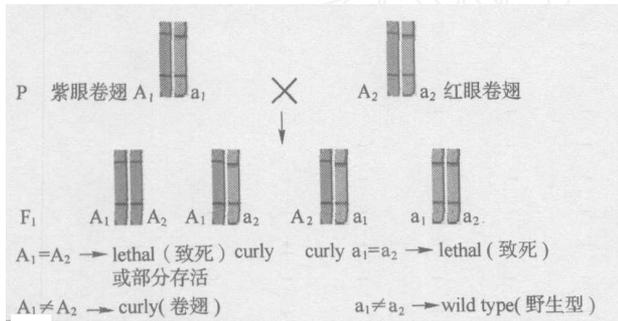


图 3 红眼卷翅与紫眼卷翅杂交的 F_1 结果分析模式图

Fig. 3 Schematic analysis of cross of two curly stocks

2.2 分子实验结果分析

在用 14 对引物扩增果蝇基因组上 *syt* 与 *Alp23B* 基因之间一段 5 548 bp 的区域时, 电泳分析结果发现第 8 对引物扩增的片段在野生型和卷翅突变体间存在多态性(图 4), 野生型为 AA 型, 而卷翅突变体为 AB 型。在进一步的验证中, 从紫眼卷翅, 红眼卷翅 2 个卷翅品系和野生型随机挑选各 200 只成蝇分别提取 DNA, 用第 8 对引物进行单只果蝇的 PCR 扩增, 结果野生型均为 AA 型, 而卷翅突变体均为 AB 型。这结果与卷翅突变体是杂合子的特性是相符的。第 8 对引物序列: Forward 5' GTCCAA GTTGTCAA TTCCGTTC3'; Reverse 5' TTAAATCGA GGCTGCAATA TGTC3'。PCR 扩增的条件是: 预变性 94 °C 4 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

由于卷翅突变体杂合子的特性, 必须进一步验证 A 或 B 哪一条带是来自 Cy 染色体, 为此, 从野生型与紫眼卷翅、红眼卷翅 2 个不同的卷翅品系杂交

的 F_1 代中分别随机挑选了 200 只野生型卷翅个体分别提取 DNA, 然后用第 8 对引物进行单只果蝇的 PCR 扩增, 结果野生型个体均为 AA 型, 而卷翅个体均为 AB 型。这表明 B 带是来自 Cy 染色体, 而 A 带来自 Cy 同源染色体。这一结果可用来验证红眼卷翅与紫眼卷翅中的卷翅基因为等位基因, 它们间不能互补, 在杂合状态下是致死的假设。

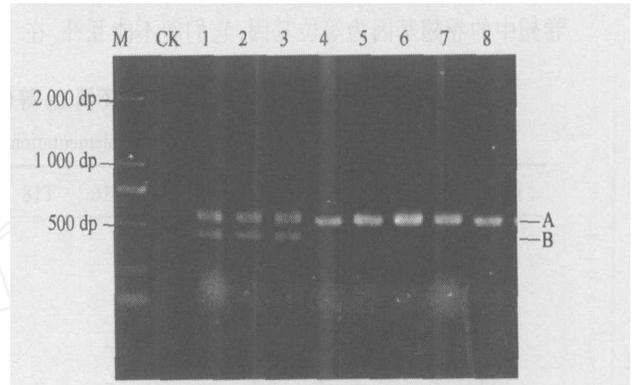


图 4 用第 8 对引物扩增的 PCR 产物

Fig. 4 PCR products amplified with the 8th pair primer

若 2 个卷翅基因在杂合状态下不致死, 则当紫眼卷翅与红眼卷翅杂交产生的 F_1 代卷翅个体的基因组用第 8 对引物扩增时, 其 PCR 产物将出现 BB 型的个体。从紫眼卷翅、红眼卷翅 2 个不同的卷翅品系杂交的 F_1 代中分别随机挑选了 200 只卷翅个体分别提取 DNA, 然后用第 8 对引物进行单只果蝇的 PCR 扩增; 但琼脂糖电泳分析, 没有发现 BB 基因型的个体, 均为 AB 型。这就从分子水平上验证了红眼卷翅与紫眼卷翅中的卷翅基因为等位基因, 它们间不能互补, 在杂合状态下是致死的假设。

3 结论与讨论

1) 紫眼卷翅与野生型杂交, F_1 代中卷翅与野生型的比例均为 1:1, 说明紫眼卷翅突变体是显性杂合子, 是平衡致死系, 纯合致死, 杂合存活; 虽然紫眼卷翅个体为杂合子, 但在自繁过程中能保持卷翅表型, 没有野生型个体出现, 这与 Lenore 的研究结果是一致的^[2]。紫眼卷翅与野生型杂交 F_1 代卷翅个体自交的 F_2 中, 紫眼与红眼、卷翅与野生型 2 对性状符合孟德尔自由分离与组合定律, 说明在紫眼卷翅品系中, 控制卷翅性状的基因和控制紫眼性状的基因是不连锁的。卷翅基因为一因多效, 对于翅膀它是显性, 对于果蝇的生活力, 它是隐性致死; 因此, 以果蝇为模式动物, 通过研究卷翅基因的分子

机理对于动物包括家养动物中一因多效的遗传现象很有意义。

2) 红眼卷翅与紫眼卷翅杂交 F_1 出现野生型, 表明在 2 个卷翅品系中, 分别位于 Cy 同源染色体上的隐性致死基因是不同的。红眼卷翅与紫眼卷翅杂交的 F_1 代中卷翅 (curly) 与野生型 (wild) 的比例为 2:1, 而不是理论上的 3:1, 因为红眼卷翅与紫眼卷翅中的卷翅基因为等位基因, 它们间不能互补, 在

杂合状态下是致死的。Littleton 等的研究报道, 在不同卷翅 (Cy) 等位基因间组合中, 有些组合的个体是致死的, 而那些能部分互补的组合, 它们的后代同野生型相比表现出身体明显的减小, 翅膀边缘微卷起^[5](表 7)。用第 8 对引物扩增 2 个卷翅品系杂交的 F_1 代卷翅个体, 发现被检测个体的基因型全为 AB 型, 验证了 2 个来自不同品系间卷翅基因间不能互补, 它们组合的个体是致死的。

表 7 不同 Cy 等位基因的互补分析^[5]

Table 7 Complementation analysis of selected Cy alleles

等位基因	Cy ed	67.3	66.5	66.14	T16	T18	T25	T31	T38	T43	T61	T62	D13	D25
Cy ed	-													
67.3	-	-												
66.5	±	-	-											
T16	-	-		±	±	-								
T18	-	-	-	-	-	-								
T25	±	-	-	-	-	-	-							
T31	±	-	-	±	-	-	-	-						
T38	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
T43	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
T61	±	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-			
T62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
D13	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±	-	-	
D25	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Df(2L)C144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54Cyrv	-	-	±	±	-	-	-	-	±	-	+	-	±	-
67Cyrv	-	-	±	±	±	±	-	±	±	-	+	-	±	-

注: - 为等位基因间不能互补, 它们间组合的个体是致死的; ± 为等位基因间部分互补, 有 1%~20% 的后代存活。

感谢北京大学生命科学院提供了本实验所用的红眼卷翅果蝇品系。

参 考 文 献

- [1] Bridges, Calvin B. Current maps of the location of the mutant genes of *Drosophila melanogaster*[J]. Proc Nation Acad Sci, 1921, 7:127-132
- [2] Ward L. The genetics of curly wing in *Drosophila*[J]. Genetics, 1923, 8:276
- [3] Spencer F A, Hoffmann F M, Gelbart W M. *Decapentaplegic*: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*[J]. Cell, 1982, 28:451-461
- [4] Ashburner M, Detwiler C, Tsubota S, et al. The genetics of a small autosomal region of *Drosophila melanogaster*, including the structural gene for alcohol dehydrogenase. Induced revertants of Scutoid[J]. Genetics, 1983, 104:405-431
- [5] Littleton J, Hugo J B. Genetic and phenotypic analysis of thirteen essential genes in cytological interval 22F1-2; 23B1-2 reveals novel genes required for neural development in *Drosophila*[J]. Genetics, 1994, 138:111-123
- [6] Lindsley D, Zimm G. The genome of *Drosophila melanogaster*[M]. New York:Academic Press, 1992
- [7] 白丽华. 紫眼卷翅果蝇繁殖力的选择[J]. 遗传, 1997, 19(增刊):95
- [8] 刘祖洞, 江绍慧. 遗传学实验[M]. 北京:高等教育出版社, 1987
- [9] Sullivan W, Ashburner M, Scott Hawley. *Drosophila* protocols[M]. Cold Spring Harbor N Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 2000
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. Cold Spring Harbor N Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- [11] 张勤, 张启能主编. 生物统计学[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2002
- [12] 李宁主编. 动物遗传学[M]. 第 2 版. 北京:中国农业大学出版社, 2003