

Н. А. ПЕРОВ, Ю. С. ЧЕНЦОВ

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИТЕННЫХ
ХРОСОМ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ЛИЧИНОК
CHIRONOMUS PLUMOSUS

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 5 VI 1970)

Как известно, политенные хромосомы двукрылых представляют собой пример хромосом, находящихся в интерфазном, активном в отношении синтезов, состоянии ⁽¹⁾. Поэтому изучение ультраструктурных особенностей проявления синтетической активности таких хромосом представляет большой интерес. На примере другого типа хромосом, активно участвующих в синтезе РНК и белка, — хромосом ооцитов тритона — было показано ⁽²⁾, что некоторые боковые петли обладают своеобразным строением, что может отображать специфичность функционирования таких участков хромосом. В связи с этим было интересно сравнить структурную организацию петель хромосом типа ламповых щеток с такими участками функциональной активности политенных хромосом, как кольца Бальбани и различные пuffs. В данном сообщении мы останавливаемся на описании структуры ядрышкового аппарата и междисковых пространств политенных хромосом слюнных желез *Chironomus plumosus* L.

Для получения ультратонких срезов с большого участка хромосом нами была применена следующая методика. Выделенные слюнные железы в капле гемолимфы помещались под покровное стекло, что приводило к уплотнению клеток и ядер; с одной стороны покровного стекла наносилась капля фиксатора, который просасывался через весь препарат при помощи фильтровальной бумаги. После короткой фиксации уплотненные железы дополнительно фиксировались в свободном виде. Для фиксации использовался 2,5% раствор глутарового альдегида на фосфатном буфере pH 7,2; после промывки буфером железы дополнительно обрабатывались 1% раствором OsO₄, обезвоживались и заключались в Эпон в плоских металлических шайбах. После всей этой процедуры было возможно анализировать структуру отдельных расправленных внутри ядра хромосом при помощи светового микроскопа (об. 90×). С препаратов, в которых хромосомы располагались в ядрах в одной плоскости, делались ультратонкие срезы, которые окрашивались солями свинца ⁽³⁾ и исследовались в электронном микроскопе HU-11B. Часть выделенных желез фиксировалась только в забуференном глутаровом альдегиде и заключалась в Эпон для окраски срезов по методу Бернара ⁽⁴⁾: окраска срезов 1 мин. 5% водным уранил-ацетатом, промывка, обработка 30 мин. 0,2 M раствором ЭДТА, снова промывка и дополнительная окраска свинцом ⁽⁵⁾. Часть желез фиксировалась после помещения личинок в водный раствор актиномицина D (2 мкг/мл) на 6 и 24 час.

Примененные методические приемы позволили получить ультратонкие срезы, на которых отдельные хромосомы удавалось проследить на длину более 100 м. В ряде случаев на сериях ультратонких срезов можно было наблюдать все четыре хромосомы и зону ядрышка.

На срезах при малых увеличениях хорошо видна специфическая структура политенных хромосом (рис. 1, 2). Вдоль хромосомы ясно различимы поперечные диски хроматина, состоящие из конденсированных фибрилл

толщиной около 200 Å. Ширина дисков варьирует от 0,15 до 1 μ. Общая их структура также разнообразна: это плотные сплошные диски; рыхлые диски, в которых хроматин расположен в виде отдельных участков; сложные диски, где хроматин как бы расслаивается на тонкие пласти. Между плотными зонами дисков располагаются светлые участки, заполненные мелкими участками хроматина и гранулами. В ряде случаев на отрезке хромосомы длиной до 100 μ прослеживалось более 50 дисков. Ядрышко в гигантских ядрах слюнных желез *Ch. plumosus* состоит из двух зон: плотной, центральной, состоящей из тесно упакованных фибрилл 40—60 Å толщиной, и рыхлой, периферической, состоящей из нуклеолоном, покрытых многочисленными гранулами величиной 150—200 Å. Такая структура ядрышка аналогична ядрышку других видов двукрылых⁽⁵⁾ (рис. 1 см. вкл. к стр. 1451).

Кроме дисков и междисковых участков, в политенных хромосомах *Ch. plumosus* встречаются многочисленные мелкие тельца, которые мы называем микроядрышками. Их размер от 0,1 до 2 μ; обычно они округлой формы, лишь иногда встречаются вытянутые вдоль диска микроядрышки. Располагаются микроядрышки рядами в междисковых участках, часто непосредственно контактируя с дисками. Такие ряды микроядрышек встречаются в разных участках различных хромосом, как в зоне основного ядрышка, так и на значительном удалении от него (стрелки на рис. 1, 1, 2). Число участков с микроядрышками велико (на отрезок хромосомы длиной до 100 μ приходится 12—17 участков с рядами микроядрышек). По своей ультраструктуре микроядрышки резко отличаются от хроматиновых глыбок; их можно подразделить на два основных типа. Первый тип микроядрышек морфологически сходен с основным гигантским ядрышком: они обладают плотной тонкофибриллярной центральной частью и волокнисто-гранулярной периферической (як I на рис. 1, 4). Второго типа микроядрышек представлен плотными округлыми тельцами, состоящими только из тонких фибрилл толщиной около 40 Å (як II на рис. 1, 3). В зонах с микроядрышками первого типа встречаются микроядрышки второго типа; наоборот, в зонах с микроядрышками второго типа гранулярных форм микроядрышек не встречается. Обычно размер и число фибриллярных ядрышек больше, чем размер и число гранулярных.

При окраске по Бернару⁽⁴⁾ в нашем случае в основном ядрышке окрашивались лишь мелкие рибосомоподобные гранулы в периферической зоне, а также гранулы в микроядрышках первого типа. Центральные зоны основного ядрышка и плотнофибриллярные зоны дополнительных ядрышек первого и второго типа не окрашивались. Такое поведение микроядрышек при данной окраске не давало достаточных оснований считать эти многочисленные структуры настоящими ядрышками. Однако оказалось, что реакция как основного ядрышка, так и микроядрышек обоих типов на актиномицин D была одинаковой. Выдерживание личинок 6 час. в среде с актиномицином D (2 μг/мл) приводит к редукции гранулярного компонента в основных ядрышках и микроядрышках первого типа. Через 24 часа после воздействия актиномицина как основное ядрышко, так и микроядрышки обоих типов обнаруживают все признаки сегрегации компонентов: на их поверхности появляются так называемые шапочки (рис. 1, 5), что является характерным для ядрышек многих клеток при обработке их актиномицином⁽⁶⁾.

Структура зон колец Бальбиани у *Ch. plumosus* сходна с описанными ранее аналогичными участками у других видов двукрылых^(7, 8). Главной отличительной чертой этих зон являются многочисленные крупные гранулы (400—800 Å величиной), хроматиновые структуры здесь имеют вид небольших разбросанных глыбок.

Некоторые междисковые участки политенных хромосом *Ch. plumosus* кроме рыхло расположенных небольших участков хроматина и мелких рибосомоподобных гранул содержат также гранулы, морфологически сход-

ные с гранулами в зоне колец Бальбиани. Эти гранулы в междисковых пространствах и в зоне кольца Бальбиани резко окрашиваются по методу Бернара, так же как более мелкие рибосомы в цитоплазме и ядрышках, в то время как хроматин дисков и междисковых пространств остается светлым. Такие крупные гранулы встречаются почти по всех широких междисковых пространствах даже в тех случаях, когда в них находятся микроядрышки. Концентрация этих гранул в междисковых участках сильно варьирует. Однако встречаются участки, где число таких гранул значительно выше, чем в окружающей хромосомы кариоплазме (см. рис. 1). После воздействия актиномицином гранулы в междисковых пространствах не исчезают, хроматиновые диски становятся более плотными и резко очерченными.

В данном исследовании, как нам кажется, особый интерес представляют два наблюдения: многочисленные дополнительные ядрышки и структура междисковых участков.

Дополнительные микроядрышки, по всей вероятности, не связаны с зоной основного ядрышкового организатора: они встречаются на всех хромосомах, по всей их длине. Структурно эти образования очень близки к истинным ядрышкам. Микроядрышки первого типа наиболее сходны с истинными активными ядрышками⁽⁹⁾. Ультраструктура микроядрышек второго типа (плотные тонкофибриллярные) очень сходна с ультраструктурой ядрышек клеток, находящихся на низком уровне синтеза клеточных РНК. Такие ядрышки описаны в клетках ворсинок кишечного эпителия, в клетках ороговевающего эпителия мышей⁽⁹⁾, в клетках амфибий при раннем эмбриогенезе^(11, 12) и т. д. Поэтому можно полагать, что многочисленные плотные фибриллярные микроядрышки в политенных хромосомах *Ch. plumosus* находятся в неактивном по отношению к синтезу РНК состоянии. Природа обоих типов микроядрышек не вызывает сомнения, так как, кроме характерных черт ультраструктуры, они отвечают на воздействие актиномицином, так же как и истинные ядрышки.

Отсюда напрашивается вывод, что в политенных хромосомах *Ch. plumosus*, кроме основного ядрышкового организатора, существуют многочисленные дополнительные ядрышковые организаторы, большая часть которых находится в неактивном состоянии. Этот вывод может служить подтверждением представления о «латентных» ядрышковых организаторах⁽¹⁰⁾. Расположение микроядрышек в виде рядов указывает на множественный характер таких дополнительных ядрышковых организаторов в одном участке политенной хромосомы. Сходные наблюдения о множественных дополнительных ядрышках были получены при помощи светового микроскопа на политенных хромосомах некоторых *Sciaridae* и *Chironomidae*^(13, 14). Располагаясь в виде рядов, мелкие (0,1—0,2 μ) дополнительные ядрышки в световом микроскопе не будут разрешаться в виде отдельных структур, а будут выглядеть как участки, богатые базофильными веществами, и представлять собой так называемые базофильные диски⁽¹⁾.

Как уже указывалось, некоторые междисковые пространства содержат крупные (400—800 А) гранулы, впервые описанные Беерманом⁽⁷⁾, в области колец Бальбиани. По своим гистохимическим характеристикам эти гранулы представляют собой рибонуклеопротеиды⁽⁸⁾. Аналогичные гранулы описаны и в обычных интерфазных ядрах⁽¹⁵⁾. Интересно, что в боковых петлях хромосом типа ламповых щеток основным компонентом так называемого матрикса также являются эти крупные рибонуклеопротеидные частицы⁽²⁾. Если учесть, что и боковые петли хромосом ооцитов⁽¹⁶⁾, и кольца Бальбиани⁽¹⁷⁾ являются местами активного синтеза РНК, то существование этих гранул в междисковых пространствах политенных хромосом может указывать на то, что эти участки также представляют собой функционирующие локусы хромосом. В пользу этого говорят данные о включении, хотя и небольшом, меченых предшественников РНК в междисковые пространства⁽¹⁷⁾. Вариабильность в количестве крупных гранул

в этих участках хромосом может отражать различия в степени активности разных хромосомных локусов, которая все же значительно ниже, чем в зонах колец Бальбиани или пучков.

Однако кроме такого объяснения возможно и другое: гранулы Беермана мигрируют в междисковые пространства поличенных хромосом после их синтеза в других участках, например, в пучках. Тот факт, что в некоторых междисковых участках число таких гранул выше, чем в окружающей кариоплазме, указывает на их избирательную локализацию в хромосоме. Поэтому нам кажется второе объяснение менее обоснованным, хотя и оно указывает на определенное функциональное значение междисковых пространств в поличенных хромосомах.

В заключение необходимо отметить, что предложенный метод изучения ультраструктуры поличенных хромосом на больших участках может быть применен для более подробного картирования хромосом как у *Chironomus*, так и у *Drosophila*.

Авторы пользуются возможностью выразить свою признательность А. А. Прокофьевой-Бельговской и И. И. Кикнадзе за полезные замечания, высказанные при обсуждении этой работы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
2 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. И. Кикнадзе, В сборн. Руководство по цитологии, 2, 1969, стр. 329.
² Ю. С. Ченцов, Н. А. Перов, ДАН, 189, 874 (1969). ³ E. S. Reynolds, J. Cell Biol., 17, 209 (1963). ⁴ W. Bernhard, J. Ultrastruct. Res., 27, 250 (1968). ⁵ B. Stevens, J. Ultrastruct. Res., 11, 329 (1964). ⁶ W. Bernhard, Nat. Cancer Inst. Monograph., 23, 13 (1966). ⁷ W. Beerman, G. F. Bahr, Exp. Cell Res., 6, 195 (1954). ⁸ B. Stevens, H. Swift, J. Cell Biol., 31, 55 (1966). ⁹ Ю. С. Ченцов, Усп. совр. биол., 62, 324 (1965). ¹⁰ H. Swift, In: Symposium on Molecular Biology, Chicago, 1959, p. 266. ¹¹ K. W. Jones, J. Ultrastruct. Res., 13, 257 (1965). ¹² S. Karasaki, J. Cell Biol., 26, 937 (1965). ¹³ C. Pelling, W. Beerman, Nat. Cancer Inst. Monograph., 23, 393 (1966). ¹⁴ N. Gabrusewycz-Garcia, R. G. Kleinfeld, J. Cell Biol., 29, 347 (1966). ¹⁵ A. Monneron, W. Bernhard, J. Ultrastruct. Res., 27, 266 (1968). ¹⁶ J. G. Gall, H. G. Callan, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 48, 562 (1962). ¹⁷ C. Pelling, Chromosoma, 15, 71 (1964).