

М. Б. ЕВГЕНЬЕВ, Э. И. ЛУБЕННИКОВА, И. М. ШАПИРО

АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕДУПЛИКАЦИИ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

ХРОНОЛОГИЯ РЕДУПЛИКАЦИИ ДНК ПРИ ИНВЕРСИИ И У МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 30 XII 1970)

Показано, что хромосома высших организмов представляет собой много-репликонную систему, репродуцирующуюся асинхронно. Асинхронность редупликации ДНК наблюдается по длине одной и той же хромосомы, между гомологичными хромосомами, а также между разными хромосомами генома (¹). Следует, однако, отметить, что механизмы, определяющие хронологию редупликации хромосом, остаются в настоящее время не выясненными. До сих пор неизвестно, является ли редупликация репликона или группы их в данной хромосоме автономной. Каково влияние гетерохроматиновых районов на редупликацию эухроматиновых участков хромосом? Имеется ли связь между изменением функции гена при эффекте положения и его редупликацией?

В настоящем сообщении приводятся результаты опытов, в которых сделана попытка оценить значение генома в контроле редупликации ДНК у высших организмов.

Опыты были проведены на слюнных железах личинок третьего возраста *Drosophila virilis* и *D. littoralis* и их гибридов. Железы извлекали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. в растворе Рингера для насекомых, содержащем H^3 -тимидин в концентрации 500 μ C/мл (удельная активность 30 C/мМ, Чехословакия). Затем железы отмывали в физиологическом растворе с немеченым тимидином (100 μ г/мл), фиксировали и окрашивали ацетоорсеином. Железы проводили через молочную кислоту и приготавливали давленные препараты. Удаление покровных стекол проводили после охлаждения стекол жидким азотом. Препараты проводили по спиртам, высушивали и покрывали жидкой эмульсией типа «М» (НИИХИМФОТО, Москва). Радиоавтографы экспонировали в холо-дильнике 10 дней при 4°, проявляли в Д-19, фиксировали в Ф-10 и переводили в постоянные препараты. На радиоавтографах анализировали распределение зерен серебра в дистальном и проксимальном участках шестой микрохромосомы. Для анализа выбирали хромосомы, где фон на сопоставимой площади был равен 0—1 зерну серебра. Поэтому поправку на фон при расчетах не производили.

У *D. virilis* проксимальный по отношению к хромоцентру участок этой хромосомы содержит 5, а дистальный — 3 диска; у *D. littoralis* — наоборот. Таким образом, шестая хромосома *D. littoralis* представляет собой практически полностью инвертированную шестую хромосому *D. virilis*. Конъюгация этих хромосом в клетках слюнных желез у межвидовых гибридов, как правило, не происходит.

Для сравнения результатов была определена величина K — доля зерен серебра в проксимальном участке по отношению к общему числу зерен в проксимальном и дистальном участках шестой хромосомы.

Поскольку у изучаемых гибридов хромосомы *D. virilis* и *D. littoralis* представлены гаплоидными наборами, можно было ожидать различную интенсивность включения H^3 -тимидина в ДНК шестых хромосом у чистых видов и гибридов. Благодаря использованию относительной величины *K* эти различия не должны оказывать влияния на результаты анализа. Распределение величины *K* отклонилось от нормального.

В первой группе опытов анализировали образцы включения H^3 -тимидина в микрохромосомы у чистых видов. Оказалось, что доля зерен серебра в проксимальном участке шестой хромосомы *D. littoralis* хорошо совпадает

Таблица 1

Медиана (*Me*) распределения величины *K** для шестых хромосом *D. virilis*, *D. littoralis* и гибридов между ними

Варианты опыта	<i>D. virilis</i>	<i>D. littoralis</i>
1. <i>D. littoralis</i> (чистый вид)	—	0,17
2. <i>D. virilis</i> (чистый вид)	0,21	—
3. ♂ <i>D. littoralis</i> × ♀ <i>D. virilis</i> (гибрид F ₁)	0,37	0,05
4. ♂ <i>D. virilis</i> × ♀ <i>D. littoralis</i> (гибрид F ₁)	—	0,05

* Для шестой хромосомы *D. littoralis* *K* равно отношению числа зерен серебра в проксимальном участке к числу зерен серебра в проксимальном и дистальном участках; для *D. virilis* *K* равно соответствующей величине для гомеологичного дистального участка микрохромосомы.

с таковой в гомологичном дистальном участке той же хромосомы *D. virilis* (табл. 1). В табл. 1 представлены величины *Me* — медианы распределения значений *K*. *Me* является величиной, соответствующей 50% накопленных частот значений *K* в каждом распределении. Эти величины были получены при анализе 112 хромосом *D. littoralis* и 76 хромосом *D. virilis*. На основании этих данных можно заключить, что инверсия существенно не повлияла на распределение зерен серебра в исследуемых участках хромосом.

Так как при инверсии меняется расположение этих участков по отношению к хромоцентру, который представляет собой гетерохроматиновый район, то в данном случае гетерохроматиновые районы не оказывают существенного влияния на хронологию репликации ДНК в микрохромосоме. Эти результаты, полученные на близких видах, дают основания предполагать, что и при инверсии в чистом виде очередность редупликации участков, вовлеченных в перестройку, также не будет меняться.

Во второй группе опытов сравнивали распределение зерен серебра в шестой хромосоме *D. littoralis* в реципрокных гибридах *D. virilis* × *D. littoralis* и в той же хромосоме у чистого вида.

На основании анализа 40 хромосом у каждого из гибридов было обнаружено, что величины *Me* хорошо совпадают (табл. 1). Таким образом, направление скрещивания не оказывает существенного влияния на хронологию редупликации ДНК шестых хромосом у гибридов.

Следует отметить, что в аналогичных реципрокных скрещиваниях обнаружено (²) нарушение митоза у гибридов F₁ ♂ *D. littoralis* × ♀ *D. virilis*, тогда как у гибридов F₁ ♀ *D. littoralis* × ♂ *D. virilis* аномалии митоза, приводящие к ненормальному протеканию органогенеза, уродствам и гибели зародышей, обычно не наблюдались.

Далее мы сравнивали величины *Me*, полученные для шестой хромосомы чистого вида *D. littoralis* в первой группе опытов, с соответствующими величинами у реципрокных гибридов. Из табл. 1 можно видеть, что они различаются между собой. Сравнивая распределение доли серебра в проксимальном участке шестой хромосомы в этих случаях с помощью непараметрического критерия Колмогорова — Смирнова (³), мы обнаружили статистически значимые различия между ними ($P > 99\%$). Отсюда можно заключить, что при гибридизации хронология редупликации ДНК шестой хромосомы изменилась.

При анализе 26 микрохромосом, полученных от *D. virilis* в гибридах ♀ *D. virilis* × ♂ *D. littoralis*, оказалось, что величина *Me* равна 0,37, тогда как для чистого вида *D. virilis* она равна 0,21. Согласно критерию Колмогорова — Смирнова, различия между распределениями величины *K* в этих случаях существенны ($P > 95\%$). Таким образом, эти данные подтверждают сделанный выше вывод об изменении хронологии редупликации ДНК шестых хромосом у гибридов.

Результаты опытов были использованы также для сравнения хронологии редупликации микрохромосом *D. virilis* и *D. littoralis* в гибридном геноме. Оказалось, что соответствующие величины *Me* различаются между собой, тогда как у чистых видов они хорошо совпадают (табл. 1). Различия в распределении величины *K* в опытах с гибридами значимы ($P > 99\%$).

Можно видеть, что в микрохромосоме *D. littoralis* асинхронность репликации проксимального и дистального участков усилилась, тогда как в хромосоме *D. virilis* она уменьшилась по сравнению с чистым видом.

Итак, данные, полученные во второй группе опытов, показывают, что у межвидовых гибридов меняется характер редупликации шестых хромосом по сравнению с чистыми видами. Эти результаты свидетельствуют в пользу существования геномного контроля репликации хромосом у высших организмов. Этот вывод подтверждается данными ⁽⁴⁾, согласно которым существует координированный характер репликации отдельных участков внутри одной и той же хромосомы, а также в разных хромосомах.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
25 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ J. H. Taylor, The Structure and Duplication of Chromosomes. In: Genetic Organization, N.Y.—London, 1969, p. 163. ² Н. Н. Соколов, Взаимодействие ядра и цитоплазмы при отдаленной гибридизации животных, Изд. АН СССР, 1959. ³ В. Ю. Урбах, Математическая статистика для биологов и медиков, Изд. АН СССР, 1963, стр. 281. ⁴ E. F. Howard, W. Plaut, J. Cell Biol., 39, 2, 415 (1968).