

И. Е. ВЛАСОВА, И. И. КИКНАДЗЕ, А. И. ШЕРУДИЛО

ХОД РЕДУПЛИКАЦИИ ДНК ПРИ ПОЛИТЕНИЗАЦИИ ХРОМОСОМ В ОНТОГЕНЕЗЕ *CHIRONOMUS THUMMI*

(Представлено академиком А. Б. Жуковым 24 V 1971)

Закономерности редупликации ДНК при формировании политенных хромосом у двукрылых изучены слабо и в последнее время привлекают к себе пристальное внимание в связи с рядом вопросов: оценкой общего числа матриц ДНК, содержащихся в сформированных политенных хромосомах разных тканей личинок и имаго (¹⁻⁵); возможностью локальной «недоредупликации» или «сверхредупликации» отдельных участков хромосом в ходе их политенизации (⁶⁻⁸) и исследованием хода редупликации хромосом в онтогенезе (^{1, 2, 17}).

Наиболее изучены в этом отношении хромосомы слюнных желез двукрылых у уже сформированных личинок конца 4-го возраста.

До сих пор изменение содержания ДНК в ядрах слюнных желез *Diptera* в ходе онтогенеза оценивали в основном по изменениям их объемов (⁹⁻¹¹). Одним из наиболее удобных методов для оценки степени политениции ядер является цитофотометрия ДНК, однако применение ее для анализа ядер с политенными хромосомами и в особенности при крупных степенях политении существенно ограничивает крайне высокая неомогенность распределения хромосом (ДНК) в пределах ядра. Разработка метода количественной цитофлуориметрии ДНК в значительной мере снижает указанные трудности и повышает точность измерения (^{12, 13}).

В связи с этим нам представлялось интересным, используя цитофлуориметрический и цитофотометрический методы, исследовать закономерности редупликации ДНК при политенизации хромосом в ходе онтогенеза личинок 1-го, 2-го, 3-го и 4-го возраста *Ch. thummi*. В настоящей работе приводятся данные об уровнях политении, числе классов политении и их соотношении в слюнной железе *Ch. thummi* на отдельных стадиях метаморфоза, а также в мальпигиевых сосудах личинок конца 4-го возраста и имаго. Для оценки уровня политении хромосом слюнных желез и мальпигиевых сосудов измерялась также масса ДНК в сперматоцитах на стадии метафазы I (4C). Результаты измерения массы ДНК в ядрах слюнных желез и мальпигиевых сосудов представлены в гистограммах (рис. 1). Из гистограмм видно, что у личинок конца 4-го возраста и предкуколок в слюнной железе, как правило, имеются два основных класса политении (2^{11} — 2^{12}) (редупликация ДНК в ядрах слюнных желез личинок конца 4-го возраста практически заканчивается (¹⁴)). У части личинок обнаруживается некоторое количество ядер третьего класса (2^{13}). Два возможных соотношения классов политении у предкуколки демонстрируются на рис. 2а, б. Сравнивая гистограммы, полученные при измерении массы ДНК в ядрах слюнных желез личинок конца 4-го возраста и предкуколок, с одной стороны (рис. 1а, б), и личинок начала 4-го возраста (рис. 1в), с другой, можно видеть, что несколько классов политении выявляются уже в начале 4-го возраста. Иными словами, за весь период 4-го возраста основная масса ядер испытывает одну редупликацию и лишь отдельные ядра проходят две редупликации. Аналогично этому в слю-

ных железах личинок 1-го, 2-го и 3-го возрастов также наблюдается несколько классов полипении. Общий ход редупликации ДНК в ядрах слюнных желез *Ch. thummi* на разных этапах онтогенеза представлен на рис. 3.

Изменение массы ДНК в мальпигиевых сосудах личинок конца 4-го возраста показывает, что здесь имеются ядра трех классов полипении, хотя четкой границы между классами нет. Это, по всей вероятности, свидетельствует о продолжающемся в мальпигиевых сосудах синтезе ДНК, хотя в слюнных железах в этот период он уже в значительной мере прекращается. Четкие классы полипении обнаруживаются в мальпигиевых сосудах имаго, в которых редупликация ДНК завершена (рис. 1г). Общий уровень полипении в мальпигиевых сосудах ниже, чем в слюнных железах (2^8 — 2^{10} С).

Из приведенных результатов следует, что в ходе развития личинок *Ch. thummi*, длящегося около 25 дней ($t = 18$ — 20°), ядра слюнных желез испытывают 12—13 редупликаций. На всех изученных стадиях развития личинок *Ch. thummi* ядра по количеству ДНК в них разделяются в основном на два класса. В ряде случаев имеется небольшой третий класс полипении. Такие вариации в числе классов связаны с проведением исследований в разные сезоны года. Эти данные могут свидетельствовать об определенной зависимости хода полипенизации от экологических факторов.

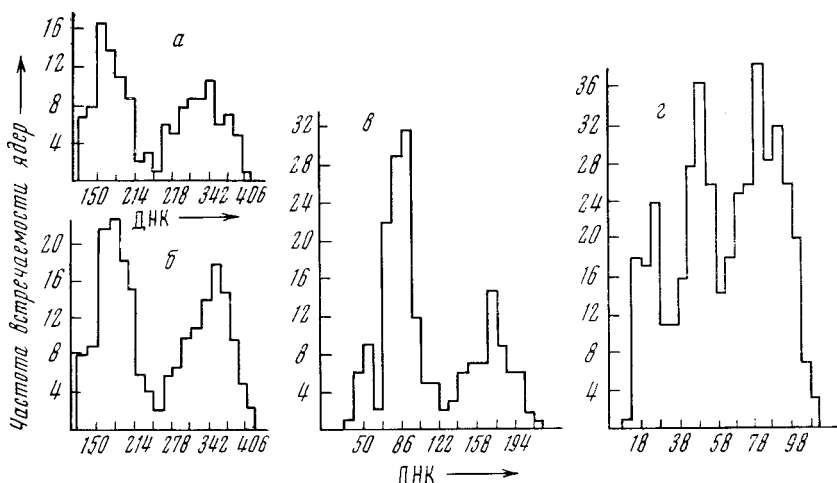


Рис. 1. Относительное содержание ДНК в ядрах слюнных желез и мальпигиевых сосудов *Ch. thummi*. Цитофлуорометрия. Гистограммы слюнных желез предкуколки (а), личинки конца 4-го возраста (б), личинки начала 4-го возраста (в) и мальпигиевых сосудов имаго (г)

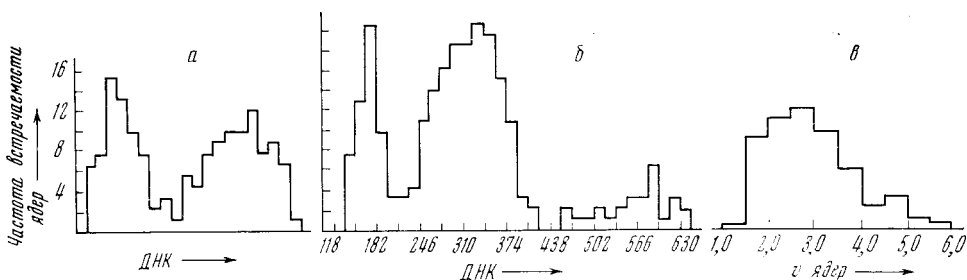


Рис. 2. Относительное содержание ДНК в ядрах слюнных желез предкуколки *Ch. thummi* (два возможных распределения) (а, б) и распределение объемов ядер в слюнной железе личинки конца 4-го возраста *Ch. thummi* (в). Цитофлуорометрия

Результаты количественного цитофотометрического исследования (рис. 3) свидетельствуют о том, что у личинки, только что вышедшей из слизи кладки, уже имеются ядра двух степеней полипении (2^3 — 2^4 C). Всего за первый возраст проходит 5—6 редупликаций, за второй 2—3 редупликации, за третий и четвертый по 1—2 редупликации. Таким образом, на более ранних стадиях развития, длящихся меньший промежуток времени (рис. 4), проходит большее число редупликаций.

В настоящее время трудно сказать, за счет каких факторов происходит «замедление» редупликационных циклов с возрастом: изменения продолжительности S-периода или удлинения промежутков между отдельными циклами редупликации. Возможно также влияние нарастающей асинхронности вступления в редупликацию отдельных ядер.

Для ответа на вопрос о возможности локальной «недоредупликации» отдельных участков хромосом в ходе полипенизации необходимо было получить ряд классов полипении и оценить, кратны ли средние значения для отдельных классов при сравнении их с диплоидным содержанием ДНК и при сравнении друг с другом (⁶⁻⁸).

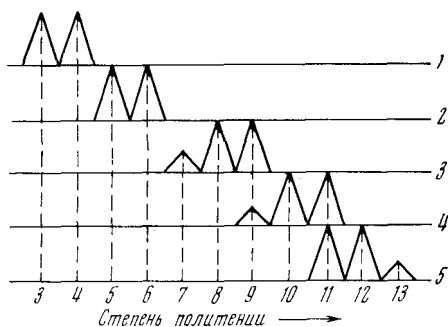


Рис. 3. Ход редупликации в ядра клеток слюнных желез *Ch. thummi* в онтогенезе. Цитофотометрия. 1 — начало 1-го возраста, 2 — 2-го, 3 — 3-го, 4 — 4-го возраста, 5 — предкуколка

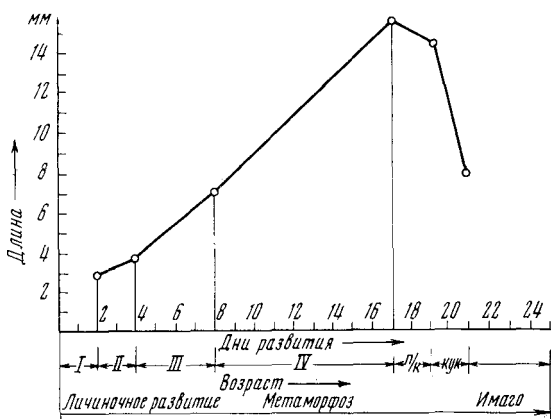


Рис. 4. Стадии развития *Ch. thummi* (модифицировано по (¹⁶))

Таблица 1

Относительное содержание ДНК в ядрах слюнных желез и мальпигиевых сосудов

	Класс I	Класс II	Класс III
Слюнные железы предкуколки	$173,3 \pm 3,0$ $C_v = 7,3\%$ $n = 71$	$341,6 \pm 5,0$ $C_v = 6,1\%$ $n = 68$	—
Слюнные железы личинки конца 4-го возраста	$176,7 \pm 2,0$ $C_v = 5,8\%$ $n = 103$	$355,3 \pm 3,7$ $C_v = 5,2\%$ $n = 101$	—
Слюнные железы личинки начала 4-го возраста	$47,8 \pm 2,4$ $C_v = 10,5\%$ $n = 18$	$84,8 \pm 0,9$ $C_v = 5,2\%$ $n = 102$	$171,9 \pm 3,8$ $C_v = 9\%$ $n = 62$
Мальпигиевы сосуды имаго	$20,3 \pm 0,45$ $C_v = 9,3\%$ $n = 70$	$48,42 \pm 0,3$ $C_v = 3,8\%$ $n = 129$	$85,3 \pm 0,4$ $C_v = 3\%$ $n = 220$
Метафазы I сперматогенеза (4C)	$0,328 \pm 0,003$ $C_v = 5\%$		

В табл. 1 приведены средние значения классов полиении для ядерных слюнных желез личинок 4-го возраста и ядер мальпигиевых сосудов имаго. Показано, что средние пяти классов полиении кратны по отношению друг к другу и к гаплоидному содержанию ДНК, т. е. можно полагать, что у хирономид в каждом цикле редупликации происходит полное завершение синтеза ДНК практически во всех участках хромосом. По-видимому, отступление от кратности, наблюдаемое у дрозофилид Радклиффом (⁶, ⁷) и Малдером (⁸), для хирономид не может быть заметным, так как гетерохроматин у них составляет ничтожную часть хроматина (¹⁵).

Многие авторы (⁹⁻¹¹) оценивали степень полиении ядер, сравнивая их с объемом диплоидного ядра. Для нас поэтому представлялось интересным сопоставить цитофотометрические данные с результатами измерения объемов. Из гистограммы (рис. 2в) видно, что распределение объемов ядер в слюнной железе личинки конца 4-го возраста является одномодальным, без выделения четких классов.

Эти данные могут свидетельствовать о том, что в полиенных ядрах нет четкой корреляции между изменением объема и изменением массы ДНК, в связи с чем использование объемов в качестве критерия полиении ведет к существенным неточностям.

Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения
Академии наук СССР
Новосибирск

Поступило
24 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. A. Alfert, Intern. Rev. Cytol., **3**, 131 (1954). ² B. J. Pettit, R. W. Rasch, E. M. Rasch, J. Cell. Physiol., **69**, 273 (1967). ³ T. C. Rodman, Genetics, **55**, 375 (1967). ⁴ B. Danesholt, I. E. Edstrom, Cytogenetics, **6**, 350 (1967). ⁵ Ф. С. Валеева, И. И. Кикнадзе, Онтогенез, **3**, 15 (1971). ⁶ G. T. Rudkin, Genetics, **52**, 470 (1965). ⁷ G. T. Rudkin, Genetics, **61**, 227 (1969). ⁸ M. P. Mulder, P. van Duijn, H. J. Gloor, Genetica, **39**, 385 (1968). ⁹ W. Beermann, Chromosoma, **5**, № 2, 139 (1952). ¹⁰ S. Besserer, Biol. Zs., **75**, 205 (1956). ¹¹ J. M. Darrow, U. Clever, Developm. Biol., **21**, 331 (1970). ¹² В. Е. Барский, В. Б. Иванов, В кн.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки. «Наука», 1964, стр. 157. ¹³ А. И. Шерудило, Изв. СО АН СССР, сер. мед.-биол., **12**, 145 (1965). ¹⁴ Т. Е. Савелева, Цитология, **6**, 765 (1968). ¹⁵ W. Beermann, Protoplasmatologia, **6**, Wien, 1962, S. 1. ¹⁶ А. С. Константинов, Биология хирономид и их разведение, Саратов, 1958. ¹⁷ G. A. Danieli, E. Rodino, Nature, **213**, 5074, 424 (1967).