

УДК 576.31

ГЕНЕТИКА

С. МЕНГЕР, Л. Я. ЛЕВИНА

ГЕТЕРОХРОМАТИЧЕСКИЕ РАЙОНЫ ХРОСОМ *Vicia faba*

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 21 IX 1973)

В последние годы новая методика окраски Гимза, позволяющая выявить дифференциальную структуру хромосом, заняла прочное место среди других цитологических методов. Наиболее широкое распространение она получила для маркирования и идентификации хромосом млекопитающих и человека (¹). Значительно меньше изучено ее применение на растительных объектах (²⁻⁴).

В настоящей работе была принята модификация методики окраски Гимза для изучения структурной дифференциации по длине хромосом *Vicia faba*, наиболее распространенного и хорошо изученного цитологически объекта.

Эксперименты были выполнены на синхронизированной 5-аминоурацилом (5-АУ) популяции клеток корневой меристемы вторичных корешков *Vicia faba* (⁵) сорта Русские черные. Для приготовления препаратов за 4 часа до фиксации в среду добавляли 0,05% колхицин. Фиксацию корешков проводили через 15 час. после отмывки 5-АУ в холодном фиксаторе (3:1). Фиксированные корешки отмывали 45% уксусной кислотой, затем проводили короткую горячую мацерацию в 45% уксусной кислоте (1—1,5 мин.). После удаления покровного стекла с помощью сухого льда препараты проводили через 96% спирт (2 смены) и абсолютный спирт, затем высушивали на воздухе. Сухие препараты помещали на 3—5 мин. в насыщенный раствор $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ при комнатной температуре. После тщательной отмывки водопроводной и дистиллированной водой препараты инкубировали 1 час в $2 \times SSC$ при pH 6,8 или при pH 7,0 при температуре 60°. Затем отмывали дистиллированной водой при pH 6,9, окрашивали свежеприготовленным раствором Гимза 10—20 мин. при комнатной температуре, снова отмывали дистиллированной водой (pH 6,9), высушивали на воздухе. Для приготовления краски использовали краситель азур-эозин по Романовскому. Перед употреблением 1 мл исходного раствора, приготовленного по методу (⁶), разводили в 10 мл фосфатного буфера при pH 6,9.

В одном из вариантов точно воспроизвели методику (³), включающую долгую предварительную мацерацию клеток 45% уксусной кислотой (1—6 час.), обработку в $2 \times SSC$ при pH 7,0 без предварительного действия $Ba(OH)_2$ и окраску (от 30 мин. до нескольких часов) при 35°.

Мы показали, что техника окраски Гимза позволяет выявить до 6 окрашенных дисков в М-хромосоме *Vicia faba* (рис. 1, ж). Локализация их совпадала во всех клетках. Два диска всегда расположены в обоих плечах около центромеры (рис. 1), причем один из них часто разделяется на три отдельных полосы (рис. 1е—з, 2б). Четкий диск постоянно наблюдается также в районе вторичной перетяжки (рис. 1б—з). В литературе он пока не описан. Часто выявляются диски в районе центромеры (рис. 1д—з). Другая методика (³), использованная на этом же объекте, позволяет выявить только 2—3 диска. Ранее (²) для выявления дифференциального окрашивания растительных хромосом предлагалось применять $Ba(OH)_2$. К сожалению, в этой краткой работе не представлены иллюстрации хромосом. В наших опытах использование гидроокиси бария, по-видимому, способст-

вовало лучшему выявлению дисков хромосом. Замечено, что длительность и температура во время предварительной мацерации не оказывает существенного влияния на окрашивание. Наилучшие результаты получили с использованием инкубации $2\times\text{SSC}$ при pH 6,8. Предварительные опыты с другими растительными объектами также дали хороший результат.

Примененная нами методика окраски Гимза дает лучшие результаты для маркирования хромосом растений, чем известные до сих пор методы

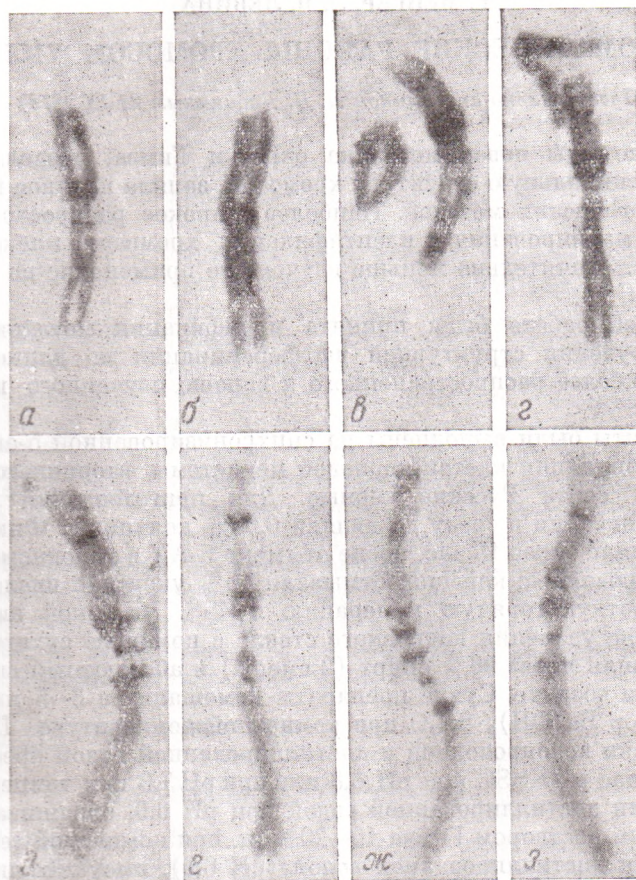


Рис. 1. Локализация окрашенных методом Гимза дисков М-хромосомы. а-з — хромосомы разных клеток

(², ³), поскольку позволяет выявить большее количество окрашенных дисков. Природа дифференциальной окраски хромосом в настоящее время активно обсуждается в литературе (¹²). Для выяснения этих вопросов мы воспользовались автордиографическим методом (введение 20-минутной импульсной метки H^3 -тимидина (4 С/мл, уд. активность 4,8 мС/ммоль) в конце периода синтеза ДНК, через 8 час. после снятия блока 5-АУ). Фиксированные корешки окрашивали по Фельгену, проводили мацерацию с помощью цитазы (⁷). Препараты покрывали жидкой эмульсией «М» и экспонировали 3 недели при 4°.

Сравнительный анализ локализации выявленных позднореплицирующихся районов и распределения окрашенных дисков по М-хромосоме позволил обнаружить их полное совпадение (рис. 2). В настоящее время считается доказанным, что позднее включение H^3 -тимидина может служить показателем наличия участков гетерохроматина в хромосоме эукариотов (⁸). В работах, выполненных на клетках млекопитающих и человека,

совпадение локализации позднореплицирующихся районов и окрашенных по Гимза служило доказательством гетерохроматиновой природы таких районов (⁹). На основании этого можно считать, что в наших опытах окрашивающиеся по Гимза локусы являются гетерохроматическими районами хромосом. Ранее, используя обработку холодом (¹⁰), а также окраску флуорохромами (¹¹), ряд авторов идентифицировали гетерохроматические районы *Vicia faba*. Однако методика, использованная в данной работе,

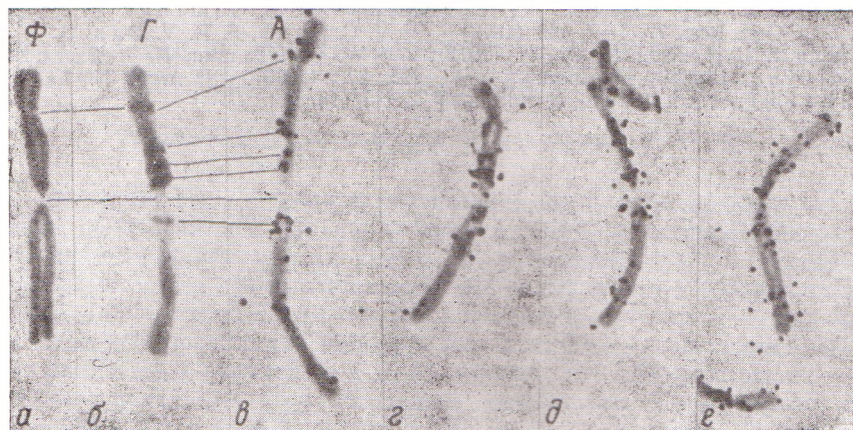


Рис. 2. Сравнительный анализ локализации метки и распределения окрашенных дисков по М-хромосоме. *Ф* — окраска по Фельгену; *Г* — окраска Гимза; *А* — автограф с H^3 -тимидином. *а* — *е* — то же, что на рис. 1

позволяет выявить дополнительные участки гетерохроматина в структуре хромосом. Обращает на себя внимание тот факт, что во всех случаях окрашенные диски наблюдались в районе вторичной перетяжки. Существует мнение, что область вторичных перетяжек представляет собой ядрышкообразующий район хромосомы или локус рибосомальных цистронов. Считается, что вторичные перетяжки не обязательно связаны с гетерохроматином, поскольку представляют собой генетически активные районы хромосом (¹²). Однако, как можно видеть из данной работы, в районе вторичной перетяжки у *Vicia faba* всегда наблюдается гетерохроматиновый диск. Подобную картину наблюдали и другие авторы, изучая повышенную чувствительность районов гетерохроматина, в том числе района вторичной перетяжки, к действию митомицина-С (¹³). Известно, что горчиный газ специфически подавляет синтез сателлитной ДНК, а не общей ДНК (¹⁴). Этим можно объяснить восприимчивость гетерохроматических областей к митомицину-С и другим алкилирующим агентам. Следует учесть, что у растений не обнаружен факультативный гетерохроматин (¹⁵). Можно полагать, что в данной работе мы имеем пример обнаружения конститутивного гетерохроматина. Конечно, для более точного утверждения требуется дополнительный тест, например, гибридизация ДНК-РНК *in situ*.

По-видимому, генетическая инактивация крупных блоков ДНК и отдельных хромосом эукариотов может осуществляться на основе механизма задержанной репликации. Данные по включению H^3 -тимидина в гетерохроматические районы в конце S-периода находятся в соответствии с этой гипотезой. Очевидно, таким же образом определяется функциональная неактивность сателлитной ДНК, составляющей основную массу конститутивного гетерохроматина.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Paris Conference, 1971, Cytogenetics, 11, 1972, p. 313. ² C. G. Vosa, P. Marchi, Nature New Biol., 237, 75, 191 (1972). ³ D. Schweizer, Chromosoma, 40, 3, 307 (1973). ⁴ N. Yamasaki, Chromosoma, 41, 4, 403 (1973). ⁵ W. Prenskey, H. Smith, J. Cell. Biol., 24, 3, 401 (1965). ⁶ H. J. Conn, M. A. Darrow, Staining Procedures used by the Biological Stain Commission, Baltimore, 1960. ⁷ А. Б. Иорданский, Цитология, 7, 120 (1965). ⁸ A. Lima-de-Faria, Handbook Molecular Cytology, North-Holland, 1969. ⁹ E. Ganner, H. I. Evans, Chromosoma, 35, 3, 326 (1971). ¹⁰ J. Mc Leish, Heredity, 6, Suppl., 125 (1953). ¹¹ T. Caspersson, L. Zech et al., Exp. Cell. Res., 58, 128 (1969). ¹² D. E. Comings, E. Avelino et al., Exp. Cell. Res., 77, 1-2, 469 (1973). ¹³ V. C. Shah, S. R. V. Rao, O. P. Aroga, Indian J. Exp. Biol., 10, 6, 431 (1972). ¹⁴ W. G. Flamm, N. J. Bernheim, I. Spalding, Biochim. et biophys. acta, 195, 273 (1969). ¹⁵ A. T. Natarajan, R. P. Sharma, G. Anström, Hereditas, 69, 2, 217 (1971).