

УДК: 576.316.352:575.222.78

ОСОБЕННОСТИ ГОМОЛОГИЧНОГО И НЕГОМОЛОГИЧНОГО СПАРИВАНИЯ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ У ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ ДРОЗОФИЛЫ

Л.А.Шакина, В.Ю.Страшнюк, В.Г.Шахбазов

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

Исследовали особенности гомологичного и негомологичного спаривания политенных хромосом у инбредных линий и гибридов F₁ дрозофилы. Полученные данные свидетельствуют о том, что частота эктопического спаривания участков 100 F и 92 EF хромосомы 3R и частота асинопсиса в хромосоме 3R зависят от генотипа. Показано влияние эктопического контакта на частоту асинопсиса гомологов хромосомы 3R, а также активность пуфинга в локусе 93D. Предполагается возможная роль пространственной организации хромосом клеточного ядра в механизме гетерозиса.

Ключевые слова: асинопсис, эктопическая конъюгация, дрозофила, гетерозис.

Введение

В соответствии с современными представлениями пространственная организация хромосом в интерфазном ядре имеет большое значение в осуществлении его генетических функций (Гвоздев, 2000; Стегний, 1993). Значительная роль в формировании архитектоники ядра принадлежит процессам гомологичного и негомологичного спаривания хромосом.

Эктопическая конъюгация хромосом обнаружена в разных типах клеток, на разных стадиях клеточного цикла, различных стадиях развития и у всех исследованных организмов — растений, животных и человека (Прокофьева-Бельговская, 1986). Взаимное притяжение негомологичных участков принимает участие в организации трехмерной структуры интерфазного ядра, создает неслучайность, упорядоченность расположения хромосом, благодаря которой обеспечивается сближение локусов, связанных между собой функционально (Cremer et al., 2001; Hilliker et al., 1980). Кроме того, эктопическое сближение районов разных хромосом в случае спонтанных или вызванных действием мутагенов разрывов в них может приводить к жизнеспособным перестройкам хромосом, имеющим важное эволюционное значение (Прокофьева-Бельговская, 1986). Известен факт транспозиции МДГ-элемента у межвидового гибрида *Drosophila virilis* x *Drosophila littoralis* из гомолога хромосомы «донора» (*virilis*) в гомолог хромосомы «реципиента» (*littoralis*) в районе непосредственного контакта участков хромосомы 5 (Evgen'ev et al., 1982). В работе (Медведева, Сатеева, 1991) показано увеличение частоты эктопических контактов в линии дикого типа *D. melanogaster* и уменьшение данного показателя у мутантной линии *agnostic (agnts3)* в ответ на стрессовое воздействие.

Конъюгация гомологичных хромосом происходит в мейозе, обеспечивая процесс обмена участком хромосом – кроссинговер (Сингер, Берг, 1998). Кроме того, спаривание гомологичных хромосом имеет место и в соматических клетках, о чем свидетельствует явление трансекции – восстановление нормального фенотипа в результате взаимодействия по-разному поврежденных генов, находящихся в гомологичных хромосомах, если нет препятствий для их спаривания и сближения поврежденных генов (Гвоздев, 2000). Соматический синапсис гомологичных хромосом в той или иной степени наблюдается в тканях двукрылых насекомых и может значительно варьировать под действием различных факторов. В работе О.В.Таглиной (1991) показаны различия в частоте нарушения конъюгации политенных хромосом у селективируемых инбредных линий, коррелирующие с их различной приспособленностью.

Учитывая важное биологическое значение процессов гомологичного и негомологичного спаривания хромосом, целью данной работы было исследование этих процессов у инбредных линий и гетерозисных гибридов F₁.

Объекты и методы исследования

Материалом для исследования служили инбредные линии дикого типа *Oregon-R (Or)*, *Canton-S (C-S)* (степень инбридинга 111-116 поколений), а также реципрокные гибриды F₁ *C-S* x *Or* и *Or* x *C-S* *D. melanogaster*. Межлинейные гибриды F₁ *C-S* x *Or* и *Or* x *C-S* обнаруживали значительный гетерозисный эффект по показателям выход имаго, теплоустойчивость имаго, яйцепродукция самок и имели значительно более низкие показатели частоты доминантных летальных мутаций по сравнению с родительскими формами (Журавльова, 2004). Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой среде при температуре 24,0±0,5°С.

Политенные хромосомы слюнных желез дрозофилы являются удобной моделью, позволяющей судить об особенностях взаимодействия хромосом в интерфазном ядре. Исследования проводили на давленных ацетоорсеиновых препаратах слюнных желез (Полуэктова, Евгеньев, 1974) при увеличении микроскопа $\times 600$. Хромосомы идентифицировали по уточненным картам Бриджеса (Lindsley, Grell, 1968). В опыт брали самок на стадии 0-часовой предкуколки.

Для оценки частоты эктопических контактов между районами хромосомы 3R 100 F и 92 EF рассчитывали отношение количества ядер с эктопическим контактом к общему количеству исследуемых ядер на препарат. Исследовали по 10-11 препаратов для каждого генотипа, в среднем по 25 ядер на каждом препарате.

Процент асинопсиса в хромосоме 3R при эктопической конъюгации участков 100 F и 92 EF политенных хромосом рассчитывали по отношению количества ядер с нарушенной конъюгацией в хромосоме 3R к общему количеству исследуемых ядер на препарат. Исследовали по 6-11 препаратов для генотипов *Or*, *C-S* \times *Or* и *Or* \times *C-S*, на каждом препарате в среднем по 25 ядер.

Также определяли частоту встречаемости асинопсиса в хромосоме 3R при отсутствии эктопического спаривания участков 100 F и 92 EF по отношению количества ядер с нарушенной конъюгацией в хромосоме 3R к общему количеству исследуемых ядер на препарат. Исследовали по 3-10 препаратов для генотипов *C-S*, *C-S* \times *Or* и *Or* \times *C-S*, на каждом препарате в среднем по 25 ядер.

Результаты и обсуждение

Данные относительно генетической вариабельности частоты эктопической конъюгации между участками 100 F и 92 EF хромосомы 3R приведены в табл. 1. Установлено, что эктопическое спаривание участков 100 F и 92 EF хромосомы 3R в линии *Or* наблюдается в 100% проанализированных препаратов. В линии *C-S* эктопические контакты не выявлены. У гибридов F_1 *C-S* \times *Or* и *Or* \times *C-S* обнаружены промежуточные значения частоты эктопической конъюгации между участками 100 F и 92 EF хромосомы 3R по сравнению с родительскими формами. Следует отметить, что в препаратах с наличием эктопического контакта тесное спаривание 100 F и 92 EF участков наблюдалось в 100% изученных ядер. Проведенный однофакторный дисперсионный анализ показал с высокой степенью достоверности ($P > 0,999$) влияние генотипа на частоту встречаемости эктопического контакта между участками 100 F и 92 EF хромосомы 3R у исследуемых линий и гибридов F_1 . Сила влияния составила $56,13 \pm 0,45$ %. Сходные результаты, за некоторым исключением, получены в работе Г.Е.Лапты, В.Г.Шахбазова (1986), где показано уменьшение частоты эктопической конъюгации теломерных концов политенных хромосом X, 2L, 3L и 3R у гибридов *D. melanogaster* Д-32 \times *Swedish*, *Swedish* \times Д-32, Д-32 \times Батуми и Батуми \times Д-32 в сравнении с линией Д-32, обладающей наиболее высокими значениями исследуемого показателя среди родительских линий (терминальные ассоциации у линий *Swedish* и Батуми были единичными или отсутствовали). Наблюдаемые в настоящем исследовании достоверные различия в частоте, с которой вступают в эктопическую конъюгацию участки 100 F и 92 EF хромосомы 3R у гомо- и гетерозиготных организмов *D. melanogaster*, по-видимому, обусловлены реально существующими различиями в прочности исследуемой ассоциации, что отражает специфичную для каждой генетической формы структурную организацию хромосом в ядре. Поскольку эктопические контакты возникают, преимущественно, в недореплицирующихся районах политенных хромосом (Zhimulev, 1998; Жимулев и др., 2000), генетические причины, приводящие к уменьшению количества личинок, обладающих эктопическим контактом у гибридов, могут быть связаны с уменьшением или полным исчезновением у последних недорепликации ДНК в районе эктопического спаривания участков 100 F и 92 EF хромосомы 3R. Уменьшение или полное исчезновение недорепликации ДНК, в свою очередь, может быть связано с увеличением диффузности хроматина и/или усилением эффективности работы репликативного комплекса у гибридов и, возможно, является одной из причин гетерозиса.

Таблица 1.

Генетическая вариабельность частоты эктопической конъюгации между участками 100 F и 92 EF хромосомы 3R у *D. melanogaster* ($M \pm m$, %)

| Генотипы | | | |
|-----------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| C-S | <i>Or</i> | <i>C-S</i> \times <i>Or</i> | <i>Or</i> \times <i>C-S</i> |
| 0,00 \pm 0,00 | 100,00 \pm 0,00 | 60,00 \pm 15,49 | 77,78 \pm 13,86 |

Установлены межлинейные различия в частоте встречаемости асиапсиса в исследуемом районе эктопического спаривания (рис. 1). Для линии *Or* частота асиапсиса равнялась $21,65 \pm 2,71$ %. Превосходство гибридов F_1 *C-S* x *Or* и *Or* x *C-S* относительно линии *Or* по исследуемому признаку составило 85,64 % ($P > 0,999$) и 79,82 % ($P > 0,999$), соответственно. Для линии *C-S*, не имеющей эктопического контакта, исследуемый показатель составил $1,67 \pm 1,17$ %. Результаты однофакторного дисперсионного анализа свидетельствуют о достоверном влиянии генотипа на частоту встречаемости асиапсиса в исследуемом районе эктопического спаривания. Сила влияния составила $3,75 \pm 1,24$ % ($P > 0,999$). Полученные данные преимущественно согласуются с результатами других работ относительно особенностей нарушения конъюгации политенных хромосом у гибридов и их родительских форм. В работе Г.Е.Лапты, В.Г.Шахбазова (1976) анализ частоты спонтанного асиапсиса в хромосомах X, 2L, 2R, 3L, 3R у линий и гибридов *D. melanogaster* показал, что у самок гибридов по отношению к линии с наибольшим нарушением конъюгации достоверно выше асиапсис 3R- и X-хромосомы. Отмечено повышение частоты нарушений конъюгации гомологов хромосомы 3 у межвидового гибрида *D. melanogaster* x *D. simulans* по сравнению с *D. melanogaster* и *D. simulans* (Evgen'ev, Polianskaya, 1976). В работе О.В.Таглиной (1991) установлено, что гетерозисный гибрид НА x ВА имеет несколько более высокий уровень спонтанного асиапсиса по сравнению с родительскими линиями, тогда как негетерозисный гибрид Горьковская x ВА по уровню асиапсиса не отличался от линии Горьковская, которая по данному признаку превосходит линию ВА. Отмеченное в большинстве случаев в литературе и наблюдаемое в ходе эксперимента увеличение степени спонтанного асиапсиса у гибридов по сравнению с родительскими линиями, вероятно, связано с полной идентичностью гомологичных хромосом у инбредов и их определенной степенью дифференцировки у гибридов. В этой связи одним из авторов выдвинута гипотеза о роли асиапсиса гомологов в активации генов как одной из причин гетерозиса (Shakhbasov, 1973). Действительно, меньшее синаптическое притяжение и более свободное расположение в ядре гомологичных хромосом у гибридов может обеспечивать более высокую диффузность хроматина и связанную с ней активную транскрипцию генов.

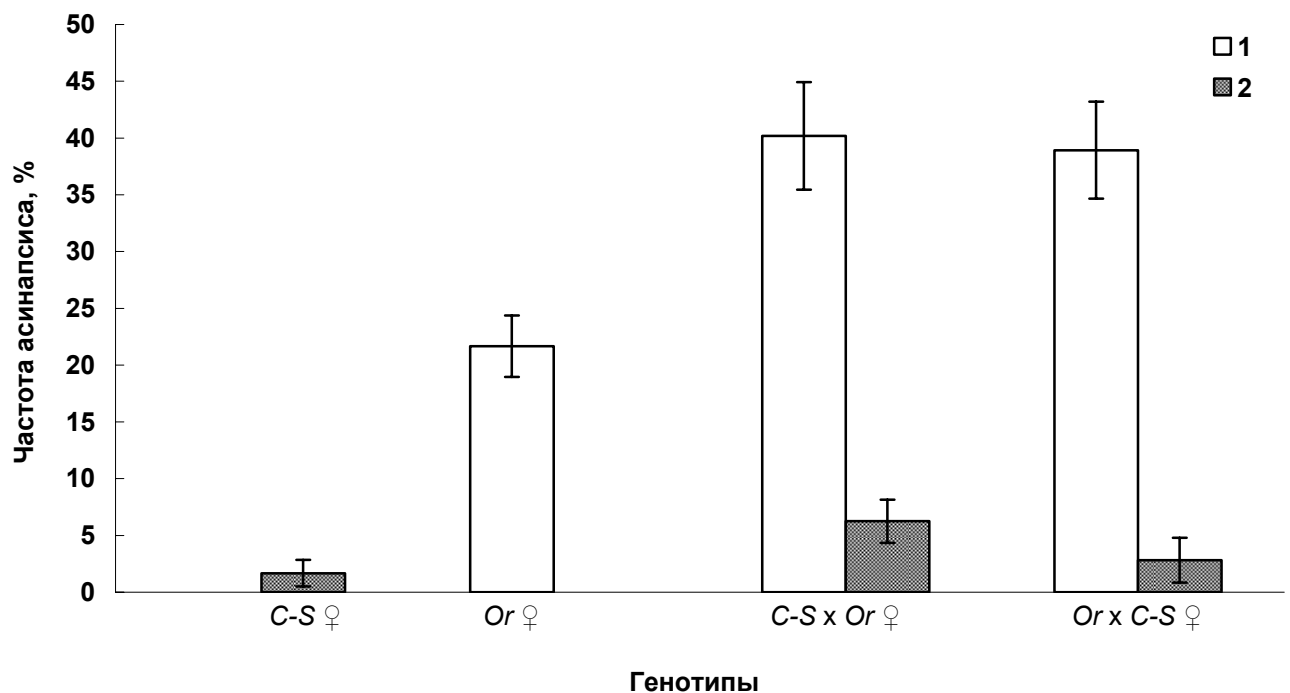


Рис. 1. Частота нарушений гомологичной конъюгации хромосом 3R у инбредных линий и гибридов *D. melanogaster* при наличии (1) и в отсутствие (2) эктопического контакта между участками 100 F и 92 EF хромосомы 3R

Следует отметить, что порог частоты встречаемости асиапсиса для отдельных плеч хромосом дрозофилы не превышает 20% (Лапта, Шахбазов, 1976, 1986; Таглина, 1992). Значения данного показателя, установленные в нашем эксперименте в исследуемом районе эктопического спаривания для линии *Or* и реципрокных гибридов F_1 *C-S* x *Or* и *Or* x *C-S* (рис. 1) превосходят порог 20%, что

позволило предположить зависимость частоты гомологичной конъюгации от негомологичного спаривания хромосом. Сравнение частот встречаемости асиансиса в хромосоме 3R при наличии/отсутствии эктопического контакта участков 100 F и 92 EF (рис. 2 Б, В) у гибридов F_1 C-S x Or и Or x C-S показало достоверное влияние ($P>0,999$) ассоциации участков 100 F и 92 EF на частоту асиансиса гомологов в хромосоме 3R. Суммарная частота асиансиса у гибридов F_1 C-S x Or и Or x C-S при наличии эктопического контакта составляла $68,12\pm 3,97\%$, тогда как в его отсутствии исследуемый показатель снижался до $5,71\pm 1,75\%$. Статистическая обработка результатов эксперимента с использованием двухфакторного дисперсионного анализа показала достоверное влияние эктопического спаривания участков 100 F и 92 EF на частоту асиансиса гомологов ($P>0,999$). Сила влияния составила $14,85\pm 0,67\%$. Достоверного влияния направления скрещивания на исследуемый показатель не установлено. Доля влияния организованных факторов – $15,08\pm 1,35\%$ ($P>0,999$). Влияние сочетания градаций обоих факторов не выявлено ($P<0,95$). В литературе имеются немногочисленные данные относительно зависимости частоты гомологичной конъюгации от негомологичного спаривания хромосом. В работе Г.Е.Лапты, В.Г.Шахбазова (1986) анализируется зависимость спонтанного асиансиса теломерных районов от неспецифических межтеломерных ассоциаций хромосом. Показано, что повышенная частота негомологичной конъюгации в теломерах X-хромосом по сравнению с аутосомами сопровождается снижением частоты нарушений гомологичной конъюгации у исследуемых линий и гибридов, тогда как суммарному уменьшению частоты межтеломерных эктопических конъюгаций у гибридов по сравнению с лучшей из родлительских форм сопутствует увеличение частоты расхождений теломер гомологов. В нашем эксперименте впервые показана зависимость гомологичной конъюгации хромосом от внутрихромосомного специфического эктопического контакта. Согласно гипотезе А.А.Прокофьевой-Бельговской (Прокофьева-Бельговская, 1986), участки асиансиса возникают в раннем эмбриогенезе в результате преждевременной конъюгации гетерохроматиновых районов хромосом, нарушающих синхронность циклов спирализации, а в дальнейшем и циклов репликации расположенных между ними участков гомологичных хромосом. Наблюдаемый нами эктопический контакт может оказывать влияние на синапсис гомологов аналогичным способом.

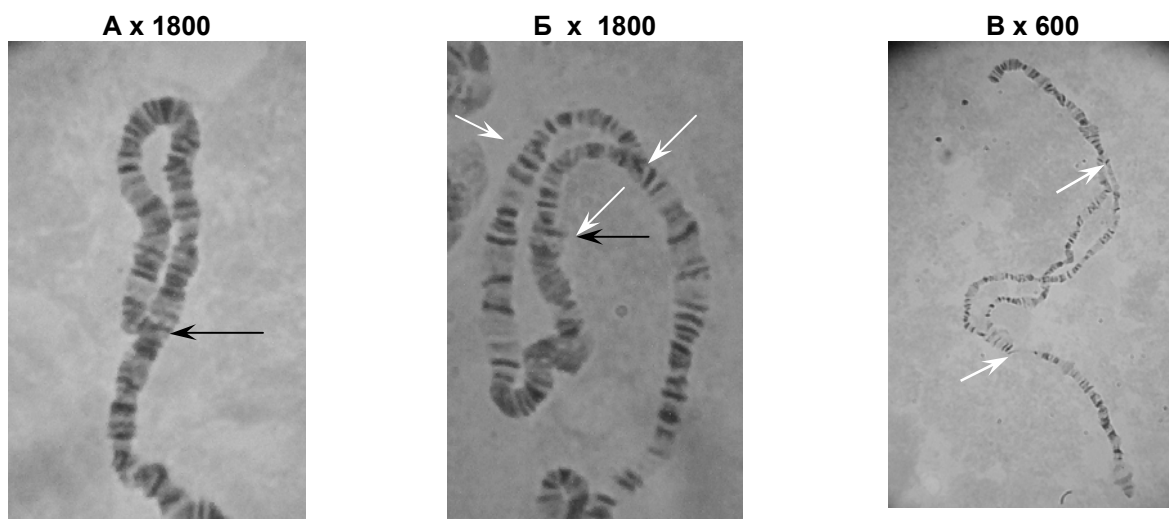


Рис. 2. Нарушение гомологичного и негомологичное спаривание в хромосоме 3R

А - эктопическая конъюгация между районами политенных хромосом 100 F и 92 EF;

Б - нарушение синапсиса при эктопической конъюгации политенных хромосом;

В - нарушение синапсиса в отсутствие эктопической конъюгации между районами политенных хромосом 100 F и 92 EF.

Черными стрелками обозначены места эктопической конъюгации, белыми – начало и конец участков асиансиса.

Учитывая известный факт об участии эктопических контактов в регуляции экспрессии генов (Гвоздев, 2000), нами была оценена взаимосвязь между частотой синапсиса 100 F и 92 EF районов хромосомы 3R и активностью пуфинга в локусах 63F, 71CE, 72CD, 82EF, 83E, 93D политенных

хромосом, исследованного ранее у линий *Or*, *C-S* и рецiproчных гибридов F_1 между ними (Шакина и др., 2005). Установлено наличие тесной положительной корреляции ($r=1$, $P>0,999$) между частотой эктопических контактов в исследуемом районе хромосомы 3R и активностью пуфинга в локусе 93D, расположенного на незначительном расстоянии от места контакта.

Выводы

Таким образом, в работе показаны некоторые особенности пространственной организации хромосом в интерфазном ядре в связи с генотипом. Установлены различия частот эктопического спаривания участков 100 F и 92 EF хромосомы 3R и частот асиапсиса в хромосоме 3R у инбредных линий и гетерозисных гибридов F_1 . Показано влияние эктопического контакта на частоту асиапсиса гомологов хромосомы 3R, а также активность пуфинга в локусе 93D.

Список литературы

- Гвоздев В.А. Пространственное расположение хромосом в клеточном ядре определяет активность генов // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т.7, №2. – С. 4–10.
- Жимулев И.Ф., Макунин И.В., Волкова Е.И. и др. Эффект четырех доз гена *SU(UR)ES* на интеркалярный гетерохроматин у *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2000. – Т.36, №8. – С. 1061–1070.
- Журавльова Л., Страшнюк В., Шахбазов В. Вплив щільності культури на прояв ефекту гетерозису у *Drosophila melanogaster* // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2004. – Вип.35. – С. 102–109.
- Лапта Г.Е., Шахбазов В.Г. Анализ специфичности эктопической конъюгации теломерных концов политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1986. – Т.22, №5. – С. 121–125.
- Лапта Г.Е., Шахбазов В.Г. Нарушение конъюгации политенных хромосом инбредных линий и межлинейных гибридов *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1976. – Т.12, №2. – С. 121–125.
- Медведева А.В., Сатеева Е.В. Влияние температуры на пространственную организацию политенных хромосом мутантов дрозофилы с измененными функциями кальмодулина // Докл. АН СССР. – 1991. – Т.318, №4. – С. 988–991.
- Полузктова Е.В., Евгеньев М.Б. Техника изготовления препаратов политенных хромосом // Методы биологии развития. М.: Наука, 1974. – С. 517–519.
- Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. – М.: Наука, 1986. – 432с.
- Сингер М., Берг П. Гены и геномы. – М.: Мир, 1998. – Т.1. – 373с.
- Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. – 110с.
- Таглина О.В. Исследование структурно-функциональных особенностей политенных хромосом *Drosophila melanogaster* в связи с эффектом гетерозиса и различиями по адаптивно важным признакам. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1991. – 16с.
- Таглина О.В. Некоторые структурно-функциональные характеристики политенных хромосом гетерозисных и негетерозисных гибридов дрозофилы // Природа, проявления и прогнозирование гетерозиса. – Киев: Наукова думка, 1992. – С. 57–62.
- Шакина Л.А., Страшнюк В.Ю., Шахбазов В.Г. Влияние плотности культуры на активность пуфинга политенных хромосом у инбредных линий и гибридов *Drosophila melanogaster* Meig. // Вестник проблем биологии и медицины. – 2005. – Вып.2. – С. 38–41.
- Cremer T., Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells // Nat. Rev. Genet. – 2001. – Vol.2, №4. – P. 292–301.
- Evgen'ev M.B., Polianskaya G.G. The pattern of of polytene chromosome synapsis in *Drosophila* species and interspecific hybrids // Chromosoma. – 1976. – Vol.57. – P. 285–295.
- Evgen'ev M.B., Yenikolopov G.N., Peunova N.J., Ilyin Yu.V. Transposition of mobile genetic elements in interspecific hybrids of *Drosophila* // Chromosoma. – 1982. – Vol.36. – P. 89–99.
- Hilliker A.J., Appels R. The genetic analysis of *D. melanogaster* heterochromatin // Cell. – 1980. – Vol.21. – P. 607–619.
- Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic variations of *Drosophila melanogaster* // Carnegie Inst. Wash. Publ. – 1968. – №627. – 472p.
- Shakhbasov V.G. Eukariotic gene activity in some connection with homologous chromosomes interaction and bioelectrical properties of the cell nucleus // Genetics. – 1973. – Vol.74, №2. – P. 249–250.
- Zhimulev I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation // Advances in Genetics. – 1998. – Vol.37. – P. 1–566.

ОСОБЛИВОСТІ ГОМОЛОГІЧНОГО І НЕГОМОЛОГІЧНОГО СПАРЮВАННЯ ПОЛІТЕННИХ ХРОМОСОМ В ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ І ГІБРИДІВ ДРОЗОФІЛИЛ.О.Шакіна, В.Ю.Страшнюк, В.Г.Шахбазов

Досліджували особливості гомологічного і негомологічного спарювання політенних хромосом в інбредних ліній і гібридів F₁ дрозофіли. Отримані дані свідчать про те, що частота ектопічного спарювання ділянок 100 F і 92 EF хромосоми 3R і частота асинапсису в хромосомі 3R залежать від генотипу. Показано вплив ектопічного контакту на частоту асинапсису гомологів хромосоми 3R, а також активність пуфінгу в локусі 93D. Припускається можлива роль просторової організації хромосом клітинного ядра в механізмі гетерозису.

Ключові слова: *асинапсис, ектопічна кон'югація, дрозофіла, гетерозис.*

PECULIARITIES OF HOMOLOGOUS AND NONHOMOLOGOUS PAIRING OF POLYTENE CHROMOSOMES IN THE INBRED LINES AND HYBRIDS OF DROSOPHILAL.A.Shakina, V.Yu.Strashnyuk, V.G.Shakhbazov

Peculiarities of homologous and nonhomologous pairing of polytene chromosomes in the inbred lines and hybrids F₁ of drosophila were studied. The data received testify that frequency of ectopic pairing of sites 100 F and 92 EF in chromosome 3R and frequency of asynapsis in chromosome 3R depend on a genotype. The influence of the ectopic contact on the frequency of 3R-chromosome homologs asynapsis and puffing activity in the locus 93D is shown. The probable role of the cell nucleus chromosome spatial organization in the mechanism of heterosis is supposed.

Key words: *asynapsis, ectopic pairing, drosophila, heterosis.*

Представлено І.П.Леженіною
Рекомендовано до друку Л.І.Воробйовою