

УДК 575.22:576.316.352

**ВПЛИВ ІЗОГЕНІЗАЦІЇ НА СТУПІНЬ ПОЛІТЕНІЇ Й АКТИВНІСТЬ ПУФІНГУ
ПОЛІТЕННИХ ХРОМОСОМ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG.**

Л. Шакіна, В. Страшнюк, В. Шахбазов

*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
пл. Свободи, 4, Харків 61077, Україна
e-mail: LyubovZ2003@mail.ru*

Досліджено вплив ізогенізації на ступінь політенії й активність пуфінгу політенних хромосом у *Drosophila melanogaster*. З'ясовано, що процес ізогенізації хромосом негативно впливає на функцію ендоредуплікації у самок дрозофіли, суттєво не змінюючи її у самців. Виявлено пригнічення транскрипційної активності політенних хромосом у локусах *2EF*, *50CD*, *71CE*, *72CD*, *83E* та її посилення в локусі *21F* у процесі ізогенізації. У локусах *22C*, *23E*, *63F*, *82EF*, *93D* розміри пуфів суттєво не змінювалися. Отримані дані є важливими для розуміння механізмів впливу ізогенізації хромосом на адаптивно важливі ознаки дрозофіли.

Ключові слова: дрозофіла, ізогенізація хромосом, політенні хромосоми, ендоредуплікація, пуфінг.

Ізогенізація, як процес одержання лише гомозиготних диплоїдів, уже давно привертає увагу дослідників. Перехід до високогомогенних ліній значно підвищує ефективність багатьох генетичних досліджень, різко прискорюючи дослідницький процес завдяки мінімізації генетичної різноманітності. Можливість виведення чистих, чи гомозиготних ліній також дає змогу вирішити низку теоретичних і практичних завдань селекції. Незважаючи на практичний інтерес до процедури ізогенізації хромосом, генетичні ефекти цього явища все ще вивчені недостатньо, особливо на хромосомному рівні, пов'язаному зі збереженням, передаванням і початковими етапами експресії генетичної інформації.

Політенні хромосоми, характерні для личинкових тканин багатьох представників *Diptera*, є унікальним об'єктом для аналізу реплікативної і транскрипційної активності хромосом. Вони виникають у результаті багатьох послідовних реплікацій кожної з хромосом диплоїдного набору і діють як інтерфазні хромосоми. Ступінь політенії – показник кількості елементарних ниток ДНП – відображає реплікативну активність хромосом і є одним із показників інтенсивності метаболізму [1]. Конформаційні зміни хромосомних дисків у пуфи – ділянки найактивнішого синтезу РНК – є характерним проявом транскрипційної активності генетичних елементів політенних хромосом [3].

Ми мали на меті дослідити вплив ізогенізації на функцію ендоредуплікації і пуфіву активність політенних хромосом *Drosophila melanogaster*. Дослідження проводили на лінії *Bar_{C-S}* (контроль), отриманій шляхом восьми насичувальних схрещувань мух неселектованої мутантної лінії *Bar* (*B*;1-57,0) з мухами дикої лінії *Canton-S* (*C-S*) та лінії *Bar_{C-S}*, ізогенної за хромосомами 2, 3, – *iso^{II} iso^{III} Bar_{C-S}* (дослід).

Мух вирощували на стандартному цукрово-дріжджовому середовищі при температурі 24±0,5 °С. Ізогенізацію хромосом проводили відповідно до класичної схеми з використанням ліній-балансера *Cy/Pm*, *D/Sb* [16]. Політенні хромосоми досліджували на давлених ацетоорсеїнових препаратах слинних залоз [7] зі збільшенням мікроскопа 800.

Ступінь політенії хромосом (СПХ) досліджували у личинок наприкінці третьої стадії розвитку. Відомо, що на цей час у них припиняється ініціація нових циклів ендореду-

плікації, і хромосоми досягають ступенів політенії 256C, 512C, 1024C і 2048C [26]. Відмінності в СПХ визначали за допомогою цитоморфометричного методу [13]. Вимірювання виконували в ділянці диска 22A хромосоми 2L, який приблизно відповідає середній ширині хромосом. Поперечні розміри хромосом з різним ступенем політенії становлять, відповідно, 1,6; 2,3; 3,2; 4,5 мкм. Чим більший ступінь політенії хромосом, тим інтенсивніше їх забарвлює ацетоорсеїн. Визначали відсотковий вміст ядер з різним ступенем політенії на тотальних препаратах слинних залоз. За результатами цих даних розраховували середні значення політенії в кожному варіанті експерименту. Самок і самців досліджували окремо, по 10–11 личинок у кожному варіанті експерименту. Всього досліджено 41 личинку дрозофіли.

Для оцінки пуфінгу політенних хромосом у дослід брали самок на стадії 0-годинної передлялечки. Цю стадію легко ідентифікувати за вивертанням дихалець. Розміри пуфів оцінювали на хромосомах з однаковим ступенем політенії 1024C. Облік ступеня політенії в подібних дослідженнях дуже важливий з огляду на прояв ефекту дози генів – зворотну залежність між пуфивою активністю і рівнем політенії хромосом [17]. Локалізували пуфи за уточненими картами Бриджеса [24]. Досліджували одинадцять пуфів трьох великих хромосом дрозофіли: 2EF (хромосома 1); 21F, 22C, 23E (хромосома 2L); 50CD (хромосома 2R); 63F, 71CE, 72CD (хромосома 3L); 82EF, 83E, 93D (хромосома 3R). Поперечні розміри пуфів вимірювали за допомогою окуляр-мікрометра і порівнювали їх з шириною прилеглого диска, не залученого до процесу пуфювання. Співвідношення розміру пуфа до розміру диска слугувало мірою пуфивої активності: 2EF/2D, 21F/22B, 22C/22B, 23E/24C, 50CD/51B, 63F/64B, 71CE/73A, 72CD/73A, 82EF/84A, 83E/84A і 93D/93F. Згідно з даними авторадіографічних досліджень, розміри пуфів корелюють з рівнем транскрипційної активності локусів [25]. Середні розміри пуфів визначали, досліджуючи 25–40 ядер у кожному варіанті експерименту у вибірці з 5–17 личинок, не більше п'яти ядер на кожному препараті. Вірогідність розходжень оцінювали за критерієм Стьюдента.

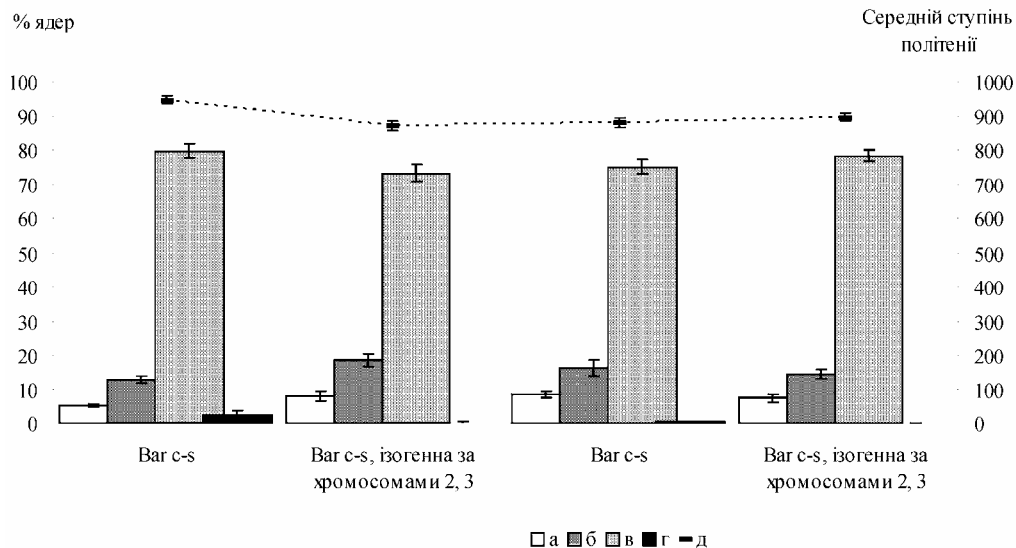


Рис. 1. Розподіл ядер з різним ступенем політенії хромосом у слинних залозах ліній *BarC-S* та *isoll isoll BarC-S*: Ширина хромосом, мкм: а – 1,6 (ступінь політенії 256C); б – 2,3 (512C); в – 3,2 (1024C); г – 4,5 (2048C); д – середній ступінь політенії.

Результати дослідження впливу ізогенізації хромосом 2, 3 *D. melanogaster* на реплікативну активність політенних хромосом відображені на рис. 1. Показано, що процес ізогенізації хромосом негативно впливав на функцію ендоредуплікації політенних хромосом у самок *D. melanogaster*, суттєво не змінюючи її у самців. Зниження середнього ступеня політенії хромосом у самок становило 8,16% ($p > 0,999$). Аналіз відсоткового співвідношення ядер з різним ступенем політенії хромосом у самок засвідчив значне зростання частки ядер зі ступенем політенії 512C – на 48,10% ($p > 0,99$) у досліді. Одночасно простежено тенденцію до зниження кількості ядер з рівнем політенії 1024C і 2048C – на 8,26 та 93,70%, відповідно та зростання відсотка ядер з найменшим ступенем політенії (256C) – на 56,11%.

Крім загальної картини зміни ступеня політенії хромосом в умовах експерименту, проаналізовано статеві відмінності за цим показником. Виявлено, що в контролі самці мали нижчі показники СПХ порівняно з самками (див. рис. 1). Статеві розходження за показником СПХ становили 6,94% ($p > 0,99$). В умовах дослідження статеві розходження недостовірні.

Для вивчення ефекту ізогенізації хромосом на транскрипційному рівні досліджували активність пуфінгу політенних хромосом на стадії 0-годинної передлячки (рис. 2). В лінії *iso^{II} iso^{III} Bar_{C,S}* виявлено зниження розмірів пуфів порівняно з гетерогенною лінією *Bar_{C,S}* в локусах 2EF, 50CD, 71CE, 72CD, 83E на 11,72 ($p > 0,99$), 10,65 ($p > 0,95$), 22,41 ($p > 0,999$), 16, 80 ($p > 0,99$) та 16, 04 % ($p > 0,95$), відповідно. Одночасно зареєстровано посилення пуфів активності в локусі 21F на 11,06 % ($p > 0,95$). У локусах 22C, 23E, 63F, 82EF, 93D розміри пуфів суттєво не змінювалися.

Ізогенізація хромосом є важливим генетичним чинником та еквівалентна швидкому інбридингу. Ми визначили збільшення частоти виникнення домінантних летальних мутацій, а також частоти мутування в локусі *Bar* лінії *Bar_{C,S}* в процесі ізогенізації хромосом 2, 3 *D. melanogaster* [4]. Літературних даних щодо впливу на реплікативну здатність і пуфінг політенних хромосом такого генетичного чинника, як ізогенізація, нема, щодо інбридингу вони суперечливі (за одними даними впливу немає, за іншими – він може бути досить значним).

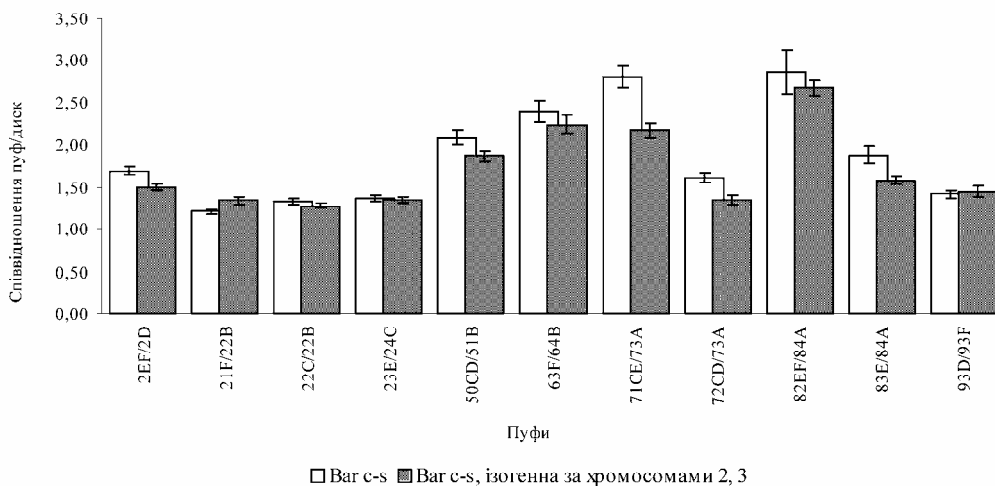


Рис. 2. Розміри пуфів політенних хромосом дрозофіли у зв'язку з ізогенізацією хромосом 2, 3.

Дослідження впливу генотипу на СПХ дрософіли не дали значних розходжень між інбредними лініями *Oregon-R* (*Or*), *Swedish* (*Sw*) і міжлінійними гібридами F_1 *Or* x *Sw* і *Sw* x *Or* [11, 12]. З іншого боку, реципрокні гібриди F_1 НА x ВА і ВА x НА значно перевершували інбредні батьківські лінії НА (низькоактивна) та ВА (високоактивна) за показником СПХ [13].

Вивчення пуфової активності політених хромосом у інбредних ліній *Oregon-R* (*Or*) і *Canton-S* (*C-S*) та міжлінійного гібрида F_1 *Or* x *C-S* не виявило значних генетичних розходжень за розмірами великих пуфів хромосоми 3 [17]. Аналогічно, аналіз набору і розмірів 65 пуфів у X-хромосомах слинних залоз дрософіли із природної популяції Алма-Ата, трьох лабораторних аутбредних ліній (Батумі-Л, *Oregon-R*, *Canton-S*) і двох високоінбредних ліній НА і ВА не виявив ніякої тенденції до зменшення активності пуфів за умов інбридингу [2]. Однак є дані, що після 36–41 поколінь інбридингу в личинок третього віку *D. melanogaster* знижується частота виникнення 28 з 114 досліджених пуфів [6], а також після 288 поколінь інбридингу в 0–2,5-годинних передлялечок простежується зменшення загальної кількості активних ділянок хромосом у *D. subobscura* з 138 до 96 [23]. У дослідженнях на стадії 0-годинної передлялечки гібриди F_1 НА x ВА та ВА x НА перевершували інбредні батьківські лінії НА та ВА за показником активності пуфінгу політених хромосом у низці з досліджених локусів трьох великих хромосом дрософіли [15].

Наведені розходження за оцінками реплікативної і пуфової активності політених хромосом у деяких випадках можуть бути пов'язані з різними методами дослідження. Автори, як звичайно, оцінювали розміри пуфів візуально, у балах; точнішими є вимірювання за допомогою об'єкт-мікрометра. Крім того, не враховували ефекту дози генів на рівні транскрипції – існування зворотної залежності пуфової активності від ступеня політенії гігантських хромосом [17]. Водночас генетична варіабельність оцінюваних параметрів у різних ліній може бути дуже значною [10, 19].

Результати, отримані в наших дослідженнях, свідчать про переважно негативний вплив процесу ізогенізації хромосом на реплікативну і пуфову активність. Цікаво те, що зміна транскрипційної активності генів є системною, торкається як ізогенізованих, так і не ізогенізованої X-хромосоми (локус *2EF*). В наших дослідженнях ізогенізація хромосом призводила також до зниження виходу імаго на 31,32% ($p > 0,95$) у самок та на 30,37% ($p < 0,95$) у самців, що узгоджується з результатами праць [10–12, 14], у яких описано зв'язок проявів функцій політених хромосом з адаптивно важливими ознаками.

У зв'язку з проведеними дослідженнями постає питання про можливі механізми впливу ізогенізації хромосом *D. melanogaster* на функцію ендоредуплікації і пуфову активність політених хромосом. З огляду на той факт, що ізогенізація геному призводить до майже повної гомозиготності лінії, можна припустити, які пригнічення реплікативної і пуфової активності політених хромосом може бути пов'язане з вищепленням у гомозиготній формі різних "дефектних" генів, у тому числі регуляторних, що контролюють процеси реплікації і транскрипції ДНК. Останніми роками накопичено дані про генетичні чинники, що впливають на швидкості транспозицій і ексцизій різних мобільних генетичних елементів (МГЕ) у дрософіли [18]. У деяких випадках доведено, що частоти транспозицій і ексцизій МГЕ зростають за умов інбридингу. Наприклад, Б'ємонт зі співавт. виявили "вибухи" транспозицій МГЕ сорія [21] і Р-елемента [20] у деяких високоінбредних лініях дрософіли. Ді Франко зі співавт. [22] знайшли надлишкову гетерозиготність МГЕ

scopia, I, jockey, МДГ4 в інбредних лініях, що пояснили індукцією транспозицій. У працях Ратнера зі співавт. наведені дані щодо безпосередньої участі процесу ізогенізації хромосом в індукції масових переміщень копій МГЕ *Dm412*. Швидкості індукції транспозицій і ексцизій копій МГЕ становлять близько 10^{-1} – 10^{-2} подій на сайт, на гаплоїдний геном, за цикл ізогенізації, що на один-два порядки перевищує спонтанний рівень транспозицій і фактично призводить до реорганізації всього малюнка локалізації копій МГЕ *Dm412* геному [8]. Аналогічно, Кайданов зі співавт. довів, що ізогенізація великих хромосом лінії НА є індукувальним чинником переміщень *hobo*-елемента в системі Н-Е гібридного дисгенезу [5]. Відповідно до сучасних даних, рухливі елементи, потрапляючи в гени, можуть не тільки їх інактивувати, спричинюючи мутації, а й здатні суттєво змінювати характер експресії генів [9]. З огляду на той факт, що різні типи мобільних елементів є дуже чутливими об'єктами щодо генетичних впливів, можна припустити, що вони також відіграють певну роль у зміні регулювання активності генів у процесі ізогенізації.

Отже, виявлено пригнічення функції ендоредуплікації і зниження транскрипційної активності в деяких локусах політенних хромосом у процесі ізогенізації. Описано статеві відмінності за показником СПХ в контролі: більші значення дослідженої ознаки у самок порівняно з самцями. Отримані дані варто враховувати під час обговорення можливих механізмів впливу ізогенізації хромосом на життєво важливі ознаки дрозофіли.

1. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М.: Наука, 1981. 260 с.
2. Беляева Е.С., Жимулев И.Ф. О вариабельности размеров пухов у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1974. Т. 10. № 5. С. 74–80.
3. Жимулев И.Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. Новосибирск: Наука, 1994. 565 с.
4. Журавлева Л.А., Страшнюк В.Ю., Шахбазов В.Г. Влияние стрессовых факторов на геном *Drosophila melanogaster* // VIII Междунар. науч. экол. конф. Белгород, 2004. С. 65–66.
5. Кайданов Л.З., Галкин А.П., Иовлева О.В., Сиделева О.Г. Направленные перемещения по геному мобильного элемента хобо в длительно селективируемой линии на *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. 1996. Т. 30. № 1. С. 23–30.
6. Лычев В.А. Изучение активности хромосом при глубоком инбридинге у дрозофилы // Цитология. 1965. Т. 7. № 3. С. 325–329.
7. Полуэктова Е.В., Евгеньев М.Б. Техника изготовления препаратов политенных хромосом // Методы биологии развития. М.: Наука, 1974. С. 517–519.
8. Ратнер В.А., Васильева Л.А. Индукция транспозиций и эксцизий мобильных генетических элементов у дрозофилы в процессе изогенезации // Генетика. 1996. Т. 32. № 7. С. 933–944.
9. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М.: Мир, 1998. Т. 1. 373 с.
10. Страшнюк В.Ю. Генетична вариабельність та адаптивні модифікації ступеня політенії гігантських хромосом у *Drosophila melanogaster* // Тр. по фундам. и прикл. генетике. Харьков: Штрих, 2001. С. 285–295.

11. *Страшнюк В.Ю., С. Аль-Хамед, Непейвода С.Н., Шахбазов В.Г.* Цитогенетическое и цитобиофизическое исследование механизмов температурных адаптаций и эффекта гетерозиса у *Drosophila melanogaster* Meig // Генетика. 1997. Т. 33. № 6. С. 793–799.
12. *Страшнюк В.Ю., Аль-Хамед С., Шаламов Ю.А., Шахбазов В.Г.* Изменение структуры и функции политенных хромосом как механизм температурной адаптации и эффекта гетерозиса у дрозофилы // Доп. НАН України. 1995. № 5. С. 139–142.
13. *Страшнюк В.Ю., Непейвода С.Н., Шахбазов В.Г.* Цитоморфометрическое исследование политенных хромосом *Drosophila melanogaster* Meig. в связи с эффектом гетерозиса, отбором по адаптивно важным признакам и полом // Генетика. 1995. Т. 31. № 1. С. 24–29.
14. *Страшнюк В.Ю., Таглина О.В., Шахбазов В.Г.* Экдизонзависимые изменения активности пуфов онтогенеза в слюнных железах дрозофилы, культивируемых *in vitro*, в связи с эффектом гетерозиса и отбором по адаптивно важным признакам // Генетика. 1991. Т. 27. № 9. С. 1512–1518.
15. *Таглина О.В.* Исследование структурно-функциональных особенностей политенных хромосом *Drosophila melanogaster* Meig. в связи с эффектом гетерозиса и различиями по адаптивно важным признакам: Автореф. дисс... канд. биол. наук. Харьков, 1992. 17 с.
16. *Тихомирова М.М.* Генетический анализ. Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1990. 280 с.
17. *Шаламов Ю. А.* Температурные условия проявления эффекта гетерозиса у *Drosophila melanogaster* Meig: Автореф. дисс... канд. биол. наук. Харьков, 1996. 17 с.
18. *Щербата Г.Р., Максимів Д.В., Черник Я.І.* Индукована мобільними генетичними елементами нестабільність генів у *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. 1999. Т. 33. № 1. С. 54–70.
19. *Эшбернер М.* Генетический и гормональный контроль пуффинга политенных хромосом *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 1974. Т. 5. № 2. С. 107–121.
20. *Biemont C., Arnault C., Heizmann A., Ronsseray S.* Massive changes in genomic localization of P elements in an inbred line of *Drosophila melanogaster* // Naturwissenschaften. 1990. Vol. 77. P. 485–488.
21. *Biemont C., Aouar A., Arnault C.* Genome reshuffling of the *copia* element in an inbred line of *Drosophila melanogaster* // Nature. 1987. Vol. 329. N 6147. P. 742–744.
22. *Di Franco C., Galuppi D., Junakovic N.* Genomic distribution of transposable elements among individuals of an inbred *Drosophila* line // Transposable elements and evolution / Ed. McDonald J. Dordrecht: Kluwer Acad. Publs., 1993. P. 95–105.
23. *Frutos R. De, Latorre A., Pascual L.* Patterns of puffing activity and chromosomal polymorphism in *Drosophila subobscura*. III. Puffing activity depression by inbreeding // Theor. Appl. Genet. 1984. Vol. 69. P. 101–110.
24. *Lindsley D.L., Grell E.H.* Genetic variations of *Drosophila melanogaster* // Carnegie Inst. Wash. Publ. 1968. N 627. 472 p.
25. *Pelling G.* Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by incorporation of uridine labelled with tritium // Nature. 1959. Vol. 184. P. 655–656.
26. *Rodman T.C.* DNA replication in salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster* at successive larval and prepupal stages // Genetics. 1967. Vol. 55. P. 375–386.

**THE INFLUENCE OF ISOGENIZATION ON THE POLYTENY DEGREE
AND THE PUFFING ACTIVITY OF POLYTENE CHROMOSOMES
IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG.**

L. Shakyna, V. Strashnyuk, V. Shakhbazov

*Karazin Kharkov National University
Svobody square, 4, Kharkov 61077, Ukraine
e-mail: LyubovZ2003@mail.ru*

The influence of isogenization on the polyteny degree (PDC) and the puffing activity of polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* was investigated. It was shown that the chromosomes isogenization influenced negatively on the function of endoreduplication in the drosophila females, but did not change it significantly in the males. The decrease of transcription activity of polytene chromosomes in the loci 2EF, 50CD, 71CE, 72CD, 83E and its increase in the locus 21F under the influence of isogenization was established. The puff sizes did not change essentially in the loci 22C, 23E, 63F, 82EF, 93D. The data received are important for understanding of mechanisms of chromosome isogenization influence on the adaptive features in drosophila.

Key words: drosophila, isogenization of chromosomes, polytene chromosomes, endoreduplication, puffing.

Стаття надійшла до редколегії 18.01.2005

Прийнята до друку 14.03.2005