

Л.А. ЖУРАВЛЕВА, В.Ю. СТРАШНЮК, В.Г. ШАХБАЗОВ

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,
пл. Свободы, 4. Харьков 61077, Украина
e-mail: LyubovZ2003@mail.tu

**ВЛИЯНИЕ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ
НА СТЕПЕНЬ ПОЛИТЕНИИ
ГИГАНТСКИХ ХРОМОСОМ
ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ
*DROSOPHILA MELANOGASTER***



Исследовали влияние плотности культуры и генотипа на степень политемии гигантских хромосом (СПХ) у *OgshorINa meIano%a\$Teg.* Обнаружено достоверное угнетение функции эндоредупликации политемных хромосом при увеличении плотности культуры. При этом показана существенная зависимость СПХ от генотипа. Установлена корреляция между СПХ и рядом адаптивно важных признаков. Обнаружен определенный параллелизм между усилением проявления эффекта гетерозиса по ряду количественных признаков и превосходством гибридов над инбредными линиями по СПХ в условиях перенаселенности. Показаны половые различия и материнский м/х/н;кт в наследовании СПХ у дрозофилы.

Ю.Л.А. ЖУРАШШВА, В.Ю. СТРАШНЮК, Ю. ШЛХБЛ.ЗОН,
ЯКИ

Введение. Высокая плотность популяции инбридированием одним из распространенных факторов, действующих и природных условиях. Влиянию фактора посвящено много работ. Показано, что при высокой плотности культуры у дрозофилы снижаются многие жизненно важные показатели: плодовитость, продолжительность жизни, размер куколок и имаго [1]. На физиологическом уровне перенаселенность вызывает формирование неспецифической адаптивной гормональной реакции насекомых, суть которой заключается в ингибировании секреции проторакотропного гормона и экдизона. Повышение содержания ювенильного гормона, что приводит к задержке метаморфоза [2]. Отмечено снижение степени политемии гигантских хромосом слюнных желез личинок линии *eyeless Drosophila melanogaster* в условиях личиночного перенаселения [3].

Согласно современным представлениям устойчивость к стрессу в значительной степени определяется генотипом [2, 4], в частности показан значительный вклад эффекта гетерозиса в повышение неспецифической устойчивости организмов [5]. В то же время мало что известно о влиянии плотности популяции на проявления эффекта гетерозиса.

Целью настоящей работы было исследование изменений степени политемии хромосом (СПХ) *D. melanogaster* в условиях различной плотности культуры в связи с эффектом гетерозиса.

Материал и методы. Объектом исследования служили инбредные линии дикого типа *D. melanogaster Oregon-R (Or)* (степень инбридинга 56-76 поколений) и *Canton-S (C-S)* (степень инбридинга 58-78 поколений), а также рецiproчные гибриды F₁ между ними.

Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой среде при температуре $24 \pm 0,5$ °C. Культуры дрозофилы развивались в сахарных стаканчиках диаметром 2,0 и высотой 10,0 см. Объем питательной среды в каждом стаканчике составлял 5 мл.

Плотность культуры задавали количеством пар родительских особей на один стаканчик: 1 пара (контроль) и 7 пар (опыт).

Политемные хромосомы исследовали на давленных ацетоорсеиновых препаратах слюнных желез [6]. Для приготовления препаратов использовали личинок конца третьего возраста. Различия по СПХ определяли цитоморфомет-

рическим методом [8]. По данным Родмана [7], инициация новых циклов эндоредупликации политемных хромосом прекращается за несколько часов до личиночно-предкуколичной линьки, и хромосомы к этому времени достигают степеней политемии 256С, 512С, 1024С и 2048С. На цитологических препаратах эти классы ядер характеризуются разной шириной политемных хромосом и интенсивностью их окрашивания ацетоорсеином [8, 9]. Измерения проводили в районе диска 22А хромосомы 2Ц который примерно соответствует средней ширине хромосом. Поперечные размеры хромосом с разной степенью политемии составляют соответственно 1,6; 2,3; 3,2; 4,5 мкм. Чем больше степень политемии хромосом, тем интенсивнее они окрашиваются ацетоорсеином. Определяли процентное соотношение ядер с разной СПХ на препаратах слюнных желез дрозофилы, а также средние значения СПХ. Самок и самцов исследовали отдельно, по 15–18 личиноклиний и гибридов в каждом варианте эксперимента. Всего было исследовано 243 особи.

Результаты экспериментов обработаны методами вариационной статистики [10]. Статистические связи оценивали с помощью коэффициента корреляции. Для оценки силы влияния генотипа и плотности культуры на изучаемые показатели применяли двухфакторный дисперсионный анализ.

Результаты исследований и их обсуждение. На рис. 1 приведены результаты исследований степени политемии хромосом у линий *C-B*, *O₂* и межлинейных гибридов Я' *C-5x O₂* \ \ *O₂x C-5* в контроле. Распределение частот ядер с разной степенью политемии хромосом у самок и самцов линий и гибридов хорошо согласуется с известными литературными данными [7]. В контроле преобладали ядра с уровнем политемии хромосом 1024С, на их долю приходится 73,48–79,54 % ядер клеток слюнных желез, 12,59-17,98 % составляли ядра клеток с уровнем политемии 512С. Остальные клетки (5,19–10,15 %) имели самый низкий (256С) и максимальный (2048С) для клеток слюнных желез *D. melanogaster* уровень политемии. Необходимо отметить, что у самцов линии *O₂* наблюдается относительно высокое содержание ядер со степенью политемии 512С — 32,98 %. Число ядер со степенью политемии 1024С, напротив, понижено — 58,26 %. Отличительной особенностью самцов линии *O₂* было также полное отсутствие ядер с максимальной степенью политемии 2048С. Генетически обусловленные различия по показателю средней степени политемии хромосом установлены в контроле только для самцов. Так, самцы линии *C-B* и гибридов превосходят линию *O_g* на 11,70-12,93 % ($P > 0,99$). Значимых различий между линиями и гибридами по показателю средней СПХ у самок в контроле не обнаружено.

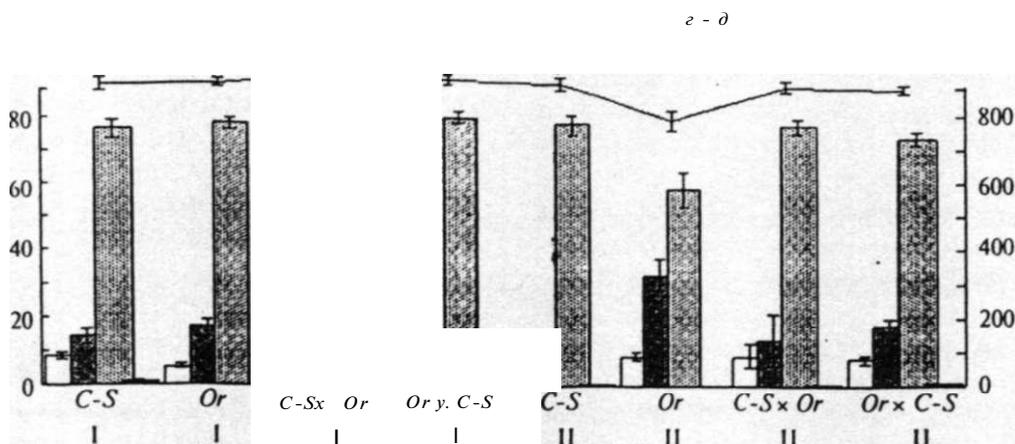


Рис. 1. Распределение ядер с разной степенью политемии хромосом и слюнных желез ЛИНИЙ И гибридов *Drosophila melanogaster* в условиях нормальной плотности культуры (1 пара родительских особей): по вертикали слева — прои. ядер, справа — средняя степень политемии; а — ширина хромосом 1,6 мкм (степень политемии 256С); б — 2,3 мкм (512С); в — 3,2 мкм (1024С); г — 4,5 мкм (2048С); д — средняя степень политемии; I — самки, II — самцы

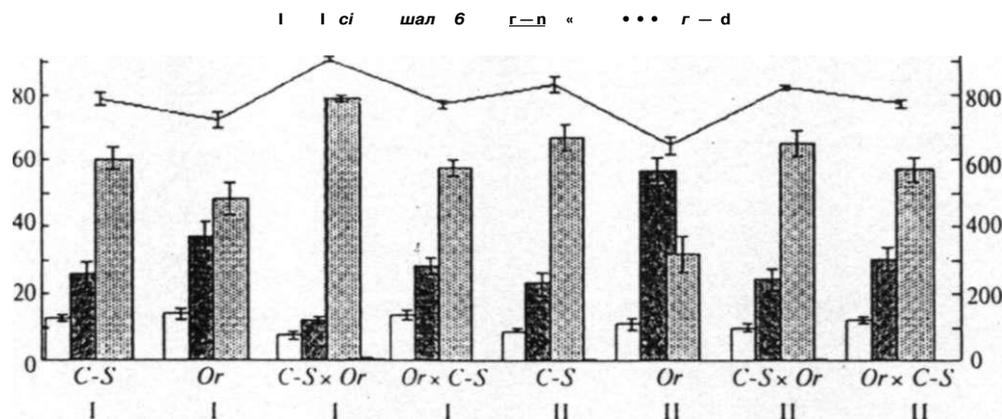


Рис. 2. Распределение ядер с разной степенью политемии хромосом в слюнных железах линий и гибридов *Drosophila melanogaster* в условиях повышенной плотности культуры (7 пар родительских особей): по вертикали слева — проц. ядер, справа — средняя степень политемии; *a* — ширина хромосом 1,6 мкм (степень политемии 256С); *b* — 2,3 мкм (5 !2С); *в* — 3,2 мкм (1024С); *г* — 4,5 мкм (2048С); *д* — средняя степень политемии; I — самки, II — самцы

Данные о распределении ядер с разной СПХ и средней СПХ в условиях высокой плотности культуры дрозофилы представлены на рис. 2. Показано, что личиночное перенаселение негативно влияет на функцию эндоредупликации политемных хромосом *£*. *melanogaster*. При повышении плотности культуры до 7 пар родительских особей изменяется процентное соотношение различных классов ядер: увеличивается количество ядер с меньшей степенью политемии — 256С и 512С и уменьшается содержание ядер со степенью политемии 1024С и 2048С. Наблюдаемое снижение средней степени политемии хромосом у линий и гибридов составило 11,84-19,27 % ($P > 0,999$) и 6,76-17,87 % ($P > 0,95$) у самок и самцов соответственно, за исключением самок гибрида *C-5x Or*, для которых различия с контролем не достоверны.

Влияние фактора плотности культуры приводило к усилению проявления генетических различий по СПХ, что отражает разную чувствительность линий и гибридов к личиночному перенаселению. Самцы линии *C-Би* гибридов превосходили линию *Она* 19,58—27,39 % ($P > 0,99$). Самки гибрида *C-5x Or* по изучаемому показателю превосходили обе инбредные линии на 14,84-25,14 % ($P > 0,999$), у гибрида *Or x C-5* обнаружен промежуточный уровень политемии хромосом по сравнению с родительскими линиями. Достоверных различий между инбредными линиями у самок в опыте

не обнаружено. Более высокая устойчивость гетерозисных гибридов к действию высокой температуры и других физических факторов установлена на многих объектах — на растениях, шелкопряде, дрозофиле [11]. В настоящей работе впервые рассмотрено влияние плотности культуры на проявление эффекта гетерозиса у *£*. *melanogaster* по показателю степени политемии хромосом.

Статистическая обработка результатов эксперимента с использованием двухфакторного дисперсионного анализа показала достоверное влияние плотности культуры ($P > 0,999$) и генотипа ($P > 0,999$) на показатель степени политемии хромосом. Сила влияния генотипа составила $0,168 \pm 0,030$ у самок и $0,275 \pm 0,038$ у самцов, фактора плотности культуры — $0,318 \pm 0,015$ и $0,172 \pm 0,019$ для самок и самцов соответственно. Для исследованного комплекса характерна большая доля влияния организованных факторов, т.е. генотип и плотность культуры определяли в значительной степени то варьирование показателя степени политемии хромосом, какое наблюдалось в эксперименте (на 56,9 % у самок и 46,8 % у самцов, $P > 0,999$).

Кроме общей картины изменения степени политемии хромосом в условиях эксперимента, проанализированы особенности проявления данного признака у разных полов. Показано, что самцы в ряде случаев обладают более низкими показателями СПХ по сравнению с самками

(рис. 1 и 2). Полные различия по показателю СПХ в контроле наиболее выражены в линии *Or*, где разница составляет 12,35 % ($P > 0,99$). В условиях повышенной плотности культуры по показателю средней СПХ самки гибрида *Or* × *C-S* превосходят самцов на 9,24 % ($P > 0,999$). Учитывая адаптивное значение политении [181, полученные данные хорошо согласуются с известным фактом о том, что более высокой устойчивостью к действию неблагоприятных факторов окружающей среды у дрозофилы обладает преимущественно гомогаметный пол [12].

В работе установлен материнский эффект в наследовании степени политении хромосом в условиях повышенной плотности культуры: самки гибрида *C-S* × *Or* превосходят гибриды *Or* × *C-S* на 14,87 % ($P > 0,999$), самцы - на 6,13 % ($P < 0,95$). В контроле реципрокного эффекта не обнаружено. Согласно литературным данным, материнский эффект в наследовании степени политении хромосом показан в эндосперме *Zea mays* [13, 14], семядолях *Pisum sativum* [15], мегакариоцитах мышей [16]. Подобного эффекта у *D. melanogaster* ранее обнаружено не было [8]. Генетический механизм материнского влияния, вероятно, связан с явлением геномного импринтинга [16, 17]. Другое возможное объяснение наблюдаемого эффекта может быть связано с действием цитоплазматического фактора [18].

Известно, что политения имеет важное приспособительное значение [18, 19]. В связи с этим наряду с изучением степени политении гигантских хромосом у *D. melanogaster* в условиях различной плотности культуры для оценки приспособленности линий и гибридов ранее мы исследовали ряд адаптивно важных признаков, таких как выход имаго, масса тела имаго, теплоустойчивость имаго, яйцепродукция самок, частота возникновения доминантных летальных мутаций (Д-ПМ) и поздних ДЛМ [20]. Установлено наличие корреляции показателя степени политении хромосом с выходом имаго ($r = 0,74$, $P > 0,95$), массой тела имаго ($r = 0,71$, $P > 0,95$), теплоустойчивостью особей ($r = 0,71$, $P > 0,95$) у самок, а также показателя степени политении хромосом с выходом имаго ($r = 0,75$, $P > 0,95$), массой тела имаго ($r = 0,73$, $P > 0,95$), частотой поздних ДЛМ ($r = -0,82$,

$P > 0,95$) у самцов. Следует отметить также однонаправленную тенденцию усиления эффекта гетерозиса по показателю СПХ и ряду количественных признаков в условиях повышенной плотности культуры. Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными работ, в которых показана корреляция степени политении гигантских хромосом с эффектом гетерозиса и проявлением ряда адаптивно важных признаков, таких как теплоустойчивость, масса тела имаго, скорость предимагинального развития особей дрозофилы [8, 9].

В связи с проведенными исследованиями возникает вопрос о механизмах влияния перенаселенности культуры на такой адаптивно важный признак, как степень политении хромосом. В исследованиях *in vivo* показано, что полноценный аминокислотный состав питательной среды для личинок *Drosophila* является необходимым фактором, инициирующим и поддерживающим репликативную способность эндоредуплицирующихся тканей (ЭРТ). Однако ЭРТ не вступают в клеточный цикл автономно, при культивировании на полноценной питательной среде, что свидетельствует о существовании некоторого посредника, который продуцируется *in vivo* в ответ на наличие (отсутствие) аминокислот и является регулятором G₁/S регуляторных генов клеточного цикла [21]. Известно также, что перенаселенность и развитие личинок на обедненной питательной среде вызывают формирование неспецифической адаптивной гормональной реакции насекомых, суть которой заключается в ингибировании секреции проторакотропного гормона и экдизона, повышении содержания ювенильного гормона, что приводит к задержке метаморфоза [2]. Стрессовое воздействие, существенно выше порогового, может вызывать обратную реакцию — ускорение метаморфоза [22]. При изучении биологического действия гормонов насекомых показано, что развитие личинок в питательной среде с добавлением аналога экдистерона приводит к снижению СПХ [23], тогда как аналог ювенильного гормона вызывает увеличение этого показателя [24]. Таким образом, в условиях повышенной плотности культуры оба фактора — голодание и изменение гормонального статуса, а возможное их сочетанное действие, может быть причи-

ной, влияющей на -экспрессию регуляторных генов клеточного цикла и вызывающей угнетение функции эндорелупликации полных хромосом.

Выводы. В работе установлено негативное влияние плотности культуры на функцию эндорелупликации полных хромосом линий и гибридов *D. melanogaster*. Показана существенная зависимость степени политенции хромосом от генотипа. Установлена корреляция показателя СПХ с такими адаптивно важными признаками, как выход имаго, масса тела имаго, теплоустойчивость имаго, частота поздних ДЛМ. Обнаружен определенный параллелизм между усилением проявления эффекта гетерозиса **по ряду** количественных признаков и превосходством гибридов над инбредными линиями **по СПХ в** условиях перенаселенности. Показаны **половые** различия и материнский эффект в **наследовании** степени политенции хромосом у дрозофилы.

SUMMARY. The influence of culture density and genotype on the polyteny degree of giant chromosomes (PDC) in *Drosophila melanogaster* was investigated. The reliable depression of the polytene chromosomes endoreduplication function under increased culture density was revealed. The essential dependence of the PDC on the genotype was shown. Correlation between the PDC and the number of adaptive features was established. The certain parallelism between the increased heterosis effect on the number of quantitative characters and the superiority of the hybrids above the inbred lines on the PDC in conditions of high culture density was found out. The sex-dependent distinctions and maternal effect at the inheritance of the PDC in *drosophila* were shown.

РЕЗЮМЕ. Досліджували вплив щільності культури та генотипу на ступінь політенії гігантських хромосом (СПХ) у *Drosophila melanogaster*. Виявлено достовірне пригнічення функції ендоредуплікації політенних хромосом при збільшенні щільності культури. При цьому показано істотну залежність СПХ від генотипу. Встановлено кореляцію між СПХ і рядом адаптивно важливих ознак. Виявлено певний паралелізм між посиленням прояву ефекту гетерозису за рядом кількісних ознак і перевагою гібридів над інбредними лініями за СПХ **в** умовах перенаселеності. Показано статеві відмінності та материнський ефект в успадкуванні СПХ у дрозофіли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лучникова Е.М. Регуляция численности и структуры популяции у дрозофилы // Дрозофила и экс-

2. Раушенбах И.К). Стресс-реакция насекомых: механизм, генетический контроль, роль в адаптации // Генетика. - 1997. — 33, № 8. — С. 1110-1118.
3. Рарог М.А., Страшнюк В.Ю., Кондратьева А.О. и др. Влияние плотности культуры на экспрессивность признака *eyeless* и степень политенции гигантских хромосом у *Drosophila melanogaster* // Генетика. - 1999. - 35, № 7. — С. 898-902.
4. Раушенбах И.Ю., Серова Л.И., Тимохина И.С., Ченцова Н.А., Шумная Л.В. Изменение содержания биогенных аминов у двух линий *Drosophila virilis* и их гибридов в онтогенезе и при тепловом стрессе // Генетика. - 1991. - 27, № 4. - С. 651-666.
5. Шихбазов В.Г. Гетерозис и теплоустойчивость // Бюл. МОИП. Отд. биол. - 1966. - 71, № 6. - С. 120-127.
6. тло.йіКтмоа Е.В., Евгениев М.Б. Техника изготовления препаратов политенных хромосом // Методы биологии развития. — М.: Наука, 1974. — С. 517-519.
7. Rodman T. C. DNA replication in salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster* at successive larval and prepupal stages // Genetics. — 1967. — 55. — P. 375-386.
8. 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. — 31, № 1. - С. 24-29.
9. Страшнюк В.Ю., Аль-Хамед С., Шалимов 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.
10. Плохинский Н.А. Биометрия. — Новосибирск : Наука, 1970. - 327 с.
11. Шахбазов В.Г. Экологическая и биофизическая генетика. — Харьков : Штрих, 2001. — 436 с.
12. Никольченко З.Т. Связь проявления гетерозиса и устойчивости с полом при разных типах гетерогаметности : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1988. - 16 с.
13. Cavallini A., Natali L., Balconi C., Rizzi E., Motto M., Cionini C., D'Amato F. Chromosome endoreduplication in endosperm cells of two maize genotypes and their progenies // Protoplasma. — 1995. — 189. — P. 156-162
14. Kowles R.V., Yerk G.L., Haas K.M., Phillips R.L. Maternal effects influencing DNA endoreduplication in developing endosperm of *Zea mays* 11 Genome. — 1997. - 40. - P. 798-805.
15. Lemontey C., Mousset-Declas C., Munier-Jolain N., Boutin J-P. Maternal genotype influences pea seed size by controlling both mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/coty-

- ledon cell size in mature seed // J. Exp. Bot. — 2000. — 51. - P. 167-175.
16. McDonald T.P., Jackson C.W. Mode of inheritance of the higher degree of megakaryocyte polyploidization in C3H mice. I. Evidence for a role of genomic imprinting in megakaryocyte polyploidy determination // Blood. - 1994. - 83. - P. 1493-1498.
17. Haig D., Westoby M. Genomic imprinting in endosperm: its effect on seed development in crosses between species and between different ploides of the same species, and its implications for the evolution of apomixis // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Ser. B. — 1991. — 333. — P. 1-13.
18. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. — М.: Наука, 19Х1. — 260 с.
19. Жимулев И.Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. — Новосибирск : Наука, 1992. — 480 с.
20. Журавлева Л.А., Страшнюк В.Ю., Шахбазов В.Г. Влияние плотности культуры на проявление эффекта гетерозиса у *Drosophila melanogaster* // Материалы VI съезда Украинского энтомологического общества. — Б. Церковь, 2003. — С. 41.
21. Britton J.S., Edgar B.A. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms // Development. — 1998. — 125. — P. 2149-2158.
22. Раушенбах И.Ю. Нейроэндокринная регуляция развития насекомых в условиях стресса. — Новосибирск : Наука, 1990. — 160 с.
23. Горенская О.В., Страшнюк В.Ю. Влияние (24R)-5и-стигмастан-3р\5,бp-триола на степень политемии гигантских хромосом линий и гибридов *Drosophila melanogaster* // Материалы VI съезда Украинского энтомологического общества. — Б. Церковь, 2003. - С. 26-27.
24. Белоусова И.Б., Страшнюк В.Ю. Влияние метопрена на степень политемии гигантских хромосом и проявление количественных признаков у *Drosophila melanogaster* // Материалы научной конференции молодых ученых. — Харьков, 2003. — С. 45-46.

Поступила 26.12.03