

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ИЗВЕСТИЯ  
СИБИРСКОГО  
ОТДЕЛЕНИЯ  
АКАДЕМИИ НАУК  
СССР

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

ВЫПУСК 2

(Отдельный оттиск)



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

1981

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дебабов В. Г., Азизбекиан Р. Р., Хлебалина О. И. и др. Выделение и предварительная характеристика экстрахромосомальных элементов ДНК *Bacillus thuringiensis*.— Генетика, 1977, т. 13, № 3.
2. Галушка Ф. П., Азизбекиан Р. Р. Исследование плазмид штаммов различных вариантов *Bacillus thuringiensis*.— Докл. АН СССР, 1977, т. 236, № 5.
3. Stahli D. P., Dingman D. W., Bulla L. A., Jr, A. I. Aronson. Possible origin and function of the parasporal crystals in *Bacillus thuringiensis*.— Biochem. and Biophys. Res., Communication, 1978, v. 84, N 3.
4. Дебабов В. Г., Хлебалина О. И., Галушка Ф. П., Сладкова И. А. Плазмиды *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*, шт. 612.— Молекул. биология, 1980, т. 14, вып. 5.
5. Плохинский Н. А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ, 1970.
6. Clewett D. D., Helinski D. R. Supercoiled circular DNA-protein complex in *E. coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form.— Proc. Nat. Acad. Sciences of the USA, 1970, 62.
7. Aaij C., Borst P. The gel electrophoresis of DNA.— Biochim. et Biophys. Acta, 1972, 269, N 2.
8. Chang S., Cohen S. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA.— Mol. and Gen. Genet., 1979, 168, N 1.
9. Crose J. H., Hodges L. L., Schiege M. N. Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*.— Infect. and Immun., 1980, 27, N 3.
10. Gemski P., Lazere J. R., Casey T. Plasmid association with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*.— Infect. and Immun., 1980, 27, N 2.
11. Lacey R. W., Chopra I. Effect of plasmid carriage on the virulence of *Staphylococcus aureus*.— J. Med. Microbiol., 1975, 8, N 1.

A. B. Gukasyan, R. A. Balman

### PECULIARITIES OF SOME STRAINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *INSECTUS* GUK. AND ISOLATION OF PLASMID DNA

The content of plasmid DNA and the pathogenicity of four *Bac. insectus* strains: K+P<sup>-</sup>, K+P<sup>+</sup>, K-P<sup>-</sup>, K-P<sup>+</sup>, were studied. The non-crystalliferous strains were not pathogenic for insects and did not contain plasmid DNA. The two crystalliferous strains had at least two plasmid DNA of different size. The attempt to transport the sign of crystallforming was not a success.

УДК 576.312.3

Л. В. ВЫСОЦКАЯ, К. Ф. ТУТУРОВА

### ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕТЕРОХРОМАТИН И СОДЕРЖАНИЕ ДНК У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ САРАНЧОВЫХ

Измерения содержания ДНК у саранчовых показали, что внутри семейства Acrididae оно меняется более, чем в два раза [1—4]. В то же время для видов этого семейства характерно удивительное единообразие кариотипов: у большинства видов кариотип представлен 11 парами акроцентрических аутосом и одной (у самцов) или двумя (у самок) половыми хромосомами. У некоторых видов подсемейства Acridinae в кариотипе 8 пар аутосом, 3 из которых мета- или субметацентрические. Иногда встречаются виды с числом аутосом, равным 18 или 20. Во всех случаях число плеч аутосом равно 22. Эти данные позволили М. Уайту сделать заключение о том, что эволюция видов сем. Acrididae связана в первую очередь со значительными вариациями в содержании ядерной ДНК [5].

Попытки связать изменения в содержании ДНК с вариациями в содержании гетерохроматина привели к выводу о том, что возрастание содержания ДНК не всегда сопровождается увеличением содержания гетерохроматина [2, 4, 6]. Анализ кинетик реассоциации ДНК у шести видов саранчовых показал широкую вариабельность как повторяющихся, так и уникальных последовательностей ДНК независимо от содержания ядерной ДНК [3]. Так, вид с практически наименьшим содержанием ДНК, как оказалось, имел до 80% повторяющихся последовательностей, в то время как у вида с содержанием ДНК примерно в два раза большим повторяющиеся последовательности составили 35% генома.

Таким образом, вопрос о том, с чем связана широкая вариабельность в содержании ДНК у саранчовых, по-прежнему остается актуальным. Интересно также и то, каким образом изменение в составе ДНК связано с изменениями в содержании гетерохроматина.

Поэтому цель настоящей работы — определение доли повторяющихся последовательностей в геноме у саранчовых с различным содержанием ДНК и оценка содержания гетерохроматина, выявляемого С-методом дифференциального окрашивания хромосом.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы пять видов саранчовых, собранных в 1978—1979 гг. (табл. 1). Определение видов проводилось по определителю саранчовых Г. Я. Бей-Биенко и Л. А. Мищенко [7].

**Измерение содержания ДНК.** Семенники саранчовых, выделенные в физиологическом растворе для клеток насекомых, фиксировали в смеси 96%-ного этилового спирта с ледяной уксусной кислотой (3:1) в течение 30 мин, затем хорошо промывали в 70%-ном спирте. Давленные препараты окрашивали реактивом Шиффа после 45-минутного гидролиза в 5 н. соляной кислоте при 24°C. Измерения проводили методом двухволновой цитоспектрофотометрии [8]. Содержание ДНК определяли в сперматидях третьего возраста. Было сделано не менее ста измерений с препаратов семенников от трех самцов каждого вида. Результаты объединяли в одну гистограмму.

**Дифференциальное окрашивание** проводили по С-методу, предложенному ранее для саранчовых [9].

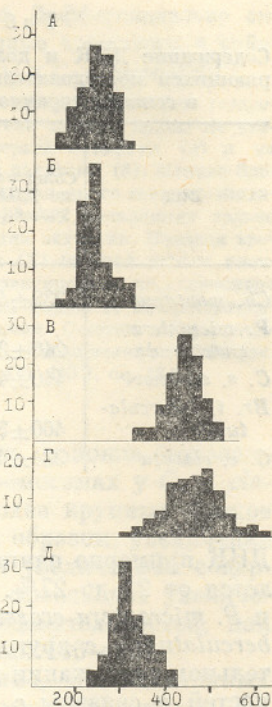
**Для выделения ДНК** использовали метод фенольной экстракции в модификации, предложенной Г. Е. Сулимовой и А. Г. Слюсаренко для тканей растений [10]. Выделенную ДНК обрабатывали РНК-азой и проназой и осаждали этиловым спиртом. ДНК характеризовалась высокой сте-

Таблица 1

Перечень изученных видов и их числа хромосом

Вид	Семейство	Подсемейство	Число хромосом у самца	Место сбора насекомых
<i>Chorthippus montanus</i> (Charp.)	Acrididae	Acridinae	17	Окрестности г. Новосибирска
<i>Pararcyptera microptera crassiuscula</i> (Zub.)			23	Окрестности г. Алматы
<i>Conophyma semenovi semenovi</i> (Zub.)		Catantopinae	23	»
<i>Bryodema tuberculatum tuberculatum</i> (F.)		Oedipodinae	23	Горный Алтай
<i>Gomphomastax clavata clavata</i> (Ostr.)	Gomphomastacidae	Gomphomastacinae	49	Окрестности г. Алматы

Рис. 1. Содержание ДНК в сперматидах 5 видов саранчовых: *Ch. montanus* (А), *P. microptera crassiuscula* (Б), *C. s. semenovi* (В), *Br. t. tuberculatum* (Г) *G. c. clavata* (Д). По оси абсцисс — содержание ДНК в условных единицах; по оси ординат — число измеренных ядер в процентах.



пению полимерности и достаточной степенью очистки от белков и полисахаридов ( $A_{260}/A_{280} \geq 1,85$ ;  $A_{260}/A_{230} \geq 2,1$ ).

ДНК фрагментировали в  $1 \times \text{SSC}$  при концентрации  $0,5-1$  мг/мл на ультразвуковом генераторе УМ1-04 при частоте  $18$  кГц и силе тока  $5$  А в течение  $4$  мин. Длину фрагментов определяли при помощи электрофореза в сложном агарозо-полиакриламидном геле, используя в качестве маркеров препараты 4StPHK, 16S и 23SpPHK *E. coli*. Длины фрагментов ДНК составили в среднем: *C. s. semenovi* —  $160$  н. п., *Ch. montanus* —  $320$  н. п., *P. microptera crassiuscula* —  $350$  н. п., *G. c. clavata* —  $430$  н. п., *Br. t. tuberculatum* —  $470$  н. п.

**Реассоциация ДНК.** ДНК денатурировали в кипящей водяной бане  $10$  мин, после чего быстро охлаждали до  $60^\circ\text{C}$ . Реассоциацию вели при  $60^\circ\text{C}$  в  $0,12$  М и  $0,4$  М фосфатном буфере образцов ДНК разных концентраций до различных значений  $C_0t$ . После отжига ДНК наносили на колонки с гидроксиданатитом, приготовленным по методу А. Л. Мазина и Г. Е. Сулимовой [11], и разделяли на одно- и двунигчатые фрагменты. Количество ДНК во фракциях определяли спектрофотометрически с учетом гиперхромного эффекта. Степень реассоциации ДНК (в процентах) рассчитывали как долю реассоциировавшей ДНК по отношению к суммарной. Для каждой из отмеченных величин  $C_0t$  делали не меньше трех измерений. Пределы колебаний полученных величин не превышали  $10\%$  от средних значений, что согласуется с данными других авторов, полученными в сходных условиях [12—14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты измерения содержания ДНК у 5 видов саранчовых представлены в виде гистограмм на рис. 1, средние значения приведены в табл. 2.

На рис. 2 показаны кривые, отражающие кинетику процесса реассоциации ДНК. Анализ этих кривых позволяет сделать вывод о наличии в ДНК изученных видов саранчовых как повторяющихся последовательностей нуклеотидов, образующих группы с различной степенью повторяемости, так и фракции уникальных последовательностей. Согласно расчетам Бриттена с соавторами, в области до  $C_0t = 1$  реассоциируют последовательности, повторенные в геноме примерно  $1500-2000$  раз и более, в области  $C_0t$  от  $1$  до  $100$  реассоциируют последовательности, повторяющиеся в среднем  $200$  раз на геном, и, наконец, уникальные последовательности реассоциируют в области  $C_0t \geq 100$  [15].

На рис. 3 представлено относительное содержание в исследованных ДНК фракций, реассоциирующих в указанных интервалах  $C_0t$ , соответствующих разной степени повторяемости нуклеотидных последовательностей. На рис. 2 и 3 видно, что доля медленно реассоциирующей фракции

Таблица 2  
Содержание ДНК и доля повторяющихся последовательностей в геномах саранчовых

Вид	Содержание ДНК, усл. ед.	Доля повтор. послед., %
<i>Ch. montanus</i>	239±4	73
<i>P. microptera crassiuscula</i>	240±3	74
<i>C. s. semenovi</i>	440±4	73
<i>Br. t. tuberculatum</i>	460±5	75
<i>G. c. clavata</i>	324±4	63

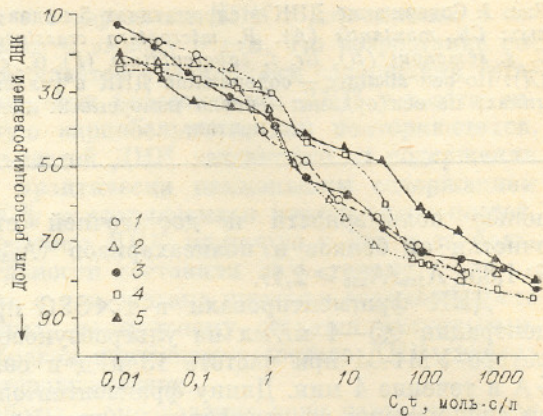
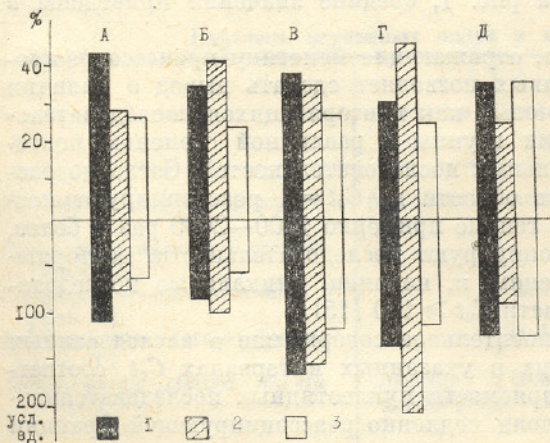


Рис. 2. Кинетика реассоциации фрагментов ДНК саранчовых разных видов. Обозначения видов 1—5 см. в табл. 2.

ДНК примерно одинакова у всех представителей сем. Acrididae и колеблется от 25 до 27%. Различия в размерах геномов между *Ch. montanus* и *P. microptera crassiuscula*, с одной стороны, и *C. s. semenovi* и *Br. t. tuberculatum* — с другой, не могут быть объяснены изменениями в относительном содержании какой-либо из фракций нуклеотидных последовательностей и связаны с более или менее пропорциональными изменениями в содержании всех фракций нуклеотидных последовательностей.

У *G. c. clavata* — представителя сем. Gomphomastacidae относительное содержание медленно реассоциирующей фракции ДНК в геноме выше, чем у видов сем. Acrididae, и составляет 37%. Однако абсолютное содержание уникальных последовательностей у *G. c. clavata* оказалось практически таким же, как у *C. s. semenovi* и *Br. t. tuberculatum*, отличающихся повышенным по сравнению с *G. c. clavata* содержанием ядерной ДНК, т. е. различие в размерах геномов у этих видов вызвано различием в содержании повторяющихся последовательностей.

На рис. 3 видно, что изученные виды саранчовых отличаются друг от друга и по содержанию последовательностей нуклеотидов, повторяющихся в геноме с различной частотой. У *Br. t. tuberculatum* по сравнению с другими видами, заметно увеличена доля последовательностей, представленных в геноме примерно 100—200 раз. У *P. microptera crassiuscula* преобладание этой фракции не столь значительно. У *G. c. clavata*, *Ch. montanus* и, менее выражено у *C. s. semenovi* преобладает фракция последовательностей, реассоциирующих при  $C_0t \leq 1$  и повторенных в геноме более 1000 раз.



Применение С-метода дифференциального окраши-

Рис. 3. Содержание фракций, реассоциирующих с различной скоростью, в ДНК саранчовых, по оси ординат вверх — доля ДНК в %; по оси ординат вниз — содержание ДНК в усл. ед.

1 — фракция ДНК, реассоциирующая при  $C_0t < 1$ , 2 — фракция ДНК, реассоциирующая при  $C_0t$  от 1 до 100, 3 — фракция ДНК, реассоциирующая при  $C_0t > 100$ . Обозначения видов те же, что и на рис. 1.

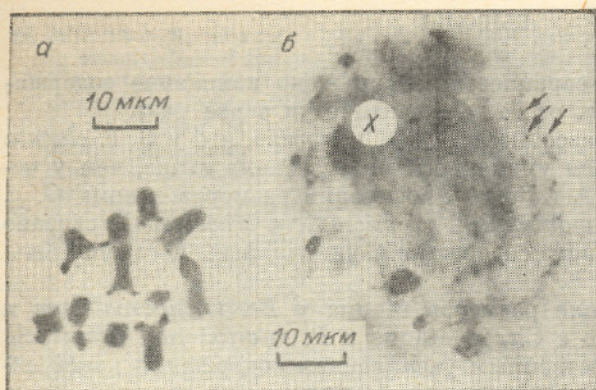


Рис. 4. Дифференциально окрашенные хромосомы в мейозе у *C. s. semenovi*.

Блоки прицентромерного гетерохроматина хорошо видны на стадии первой метафазы (а) и на стадии пахитены (б). Мелкие блоки интеркалярного гетерохроматина (стрелки) выявляются только на стадии пахитены. Половая хромосома (X) на этой стадии плотно конденсирована, но интенсивно окрашен только ее прицентромерный район. С-метод дифференциального окрашивания хромосом. Об. 100 х, ок. 12,5 х.

вания хромосом для выявления гетерохроматиновых районов показало наличие мелких прицентромерных блоков на всех хромосомах у *G. c. clavata*, *Ch. montanus* и *P. microptera crassiuscula* и более крупных блоков у *Br. t. tuberculatum* и *C. s. semenovi* (рис. 4). Таким образом, увеличение содержания ДНК у последних видов сопровождается увеличением содержания в ядре гетерохроматина. Однако при этом не происходит увеличения в геноме доли быстро реассоциирующих последовательностей, как было показано для других видов животных и растений [16—18].

Кроме прицентромерных блоков гетерохроматина, на пахитенных хромосомах саранчовых сем. Acrididae обнаружены многочисленные хромомеры, выявляющиеся только при дифференциальном окрашивании (см. рис. 4, б). Этим мелким интеркалярным гетерохроматиновым блокам оказалось больше у *C. s. semenovi* и *Ch. montanus*, т. е. у тех видов сем. Acrididae, у которых среди быстро реассоциирующих фракций ДНК преобладают последовательности, повторяющиеся в геноме более 1000 раз. Во время метафазы интеркалярный гетерохроматин у этих видов не выявляется, что, по-видимому, обусловлено высокой степенью конденсации хроматина и небольшими размерами блоков. Таким образом, при анализе метафазных хромосом эти гетерохроматиновые блоки совершенно не учитываются в отличие от более крупных интеркалярных гетерохроматиновых блоков, описанных у одного из австралийских видов саранчовых [6]. Оценка содержания гетерохроматина на стадии пахитены весьма приближительна, тем более что, возможно, существуют и более мелкие хромомеры, которые мы не обнаруживаем. Так, например, у *G. c. clavata* доля высокоповторяющихся последовательностей заметно выше, чем доля умеренных повторов, в то же время С-гетерохроматиновые блоки на пахитенных хромосомах не выявляются. Это может свидетельствовать как о небольшой величине этих блоков, так и об их отсутствии.

В настоящее время не вызывает сомнения то, что высокоповторяющиеся последовательности принимают участие в структурной организации гетерохроматиновых районов хромосом [17, 19, 20]. Исследования по гибридизации *in situ* ДНК, реассоциирующей при  $C_0t$  от 0,1 до 0, у представителя сем. Acrididae *S. gregaria* продемонстрировали распределение этой фракции нуклеотидных последовательностей по всей длине хромосом с концентрацией в районах локализации гетерохроматина [21]. Эти данные, так же как и присутствие на хромосомах многочисленных мелких гетерохроматиновых блоков, обнаруженных нами у некоторых саранчовых, можно интерпретировать как следствие гетерохроматинизации части локусов, возникших ранее в результате тандемных дупликаций. Другими словами, мы еще раз возвращаемся к гипотезе о множественной дупликации отдельных районов хромосом как механизме увеличения содержания ДНК у саранчовых [2, 4, 22, 23].

## ВЫВОДЫ

1. У изученных видов саранчовых обнаружено изменение содержания ДНК от 240 до 460 усл. ед., т. е. практически в два раза.

2. Изучение кинетик реассоциации ДНК показало, что у *G. s. clavata* (сем. Gomphomastacidae) доля уникальной части генома выше, чем у четырех представителей сем. Acrididae. Увеличение размеров генома *G. s. clavata* по сравнению с *Ch. montanus* и *P. microptera crassiuscula* связано с существенным возрастанием содержания уникальных последовательностей.

3. Двукратное увеличение размеров генома у *Br. t. tuberculatum* и *C. s. semenovi* по сравнению с *Ch. montanus* и *P. microptera crassiuscula* нельзя объяснить преимущественным увеличением содержания какой-либо из фракций нуклеотидных последовательностей.

4. Кроме блоков прицентромерного гетерохроматина, у видов сем. Acrididae удалось обнаружить мелкие интеркалярные блоки гетерохроматина на стадии пахитены. В метафазных хромосомах они маскируются высокой степенью конденсации хроматина и не выявляются. Обнаружено, что этих блоков больше у тех видов, у которых содержание высокоповторяющихся последовательностей ДНК выше содержания умеренных повторов.

Новосибирский государственный университет,  
Институт биологии моря ДВНЦ АН СССР,  
Владивосток

Поступила в редакцию  
19/II 1981

## ЛИТЕРАТУРА

1. John B., Hewitt G. M. Karyotype stability and DNA variability in the Acrididae.— *Chromosoma*, 1966, 20.
2. Кикнадзе И. И., Высоцкая Л. В. Измерение массы ДНК на ядро у видов саранчовых с разным числом хромосом.— *Цитология*, 1970, 12.
3. Wilmore P. J., Brown A. K. Molecular properties of orthopteran DNA.— *Chromosoma*, 1975, 51.
4. Rees H., Shaw D. D., Wilkinson P. Nuclear DNA variation among acridid grasshoppers.— *Proc. roy. Soc. Lond.*, 1978, B 202.
5. White M. J. D. Animal cytology and evolution. Cambridge: University Press, 1973.
6. King M., John B. Regularities and restrictions governing C-band variation in acridoid grasshoppers.— *Chromosoma*, 1980, 76.
7. Бей-Биенко Г. Я., Мищенко Л. А. Саранчовые фауны СССР. М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1951.
8. Шерудило А. И. Цитофотометрия в видимой области спектра.— *Изв. СО АН СССР*, 1946, № 12. Сер. биол.-мед. наук, вып. 3.
9. Jones G. H., Stamford W. K., Perry P. E. Male and female meiosis in grasshoppers. II. *Chorthippus brunneus*.— *Chromosoma*, 1975, 51.
10. Сулимова Г. Е., Слюсаренко А. Г. Выделение дезоксирибонуклеиновых кислот из тканей высших растений.— В кн.: *Строение ДНК и положение организмов в системе*. М.: МГУ, 1972.
11. Мазин А. Л., Сулимова Г. Е. Хроматография нуклеиновых кислот, белков и некоторых фагов на гранулированном гидроксипатите.— *Биохимия*, 1975, 40.
12. Тимофеева М. Я., Эйсер Г. И., Куприянова Н. С. Сравнительное исследование повторяющихся нуклеотидных последовательностей в ДНК дифференцированных тканей и при малигнизации.— *Молек. биол.*, 1975, 9.
13. Шнеер В. С., Антонов А. С. Исследование кинетики реассоциации ДНК растений из семейства касатиковых.— *Науч. докл. Высш. школы, биол. науки*, 1976, № 8.
14. Гинатулин А. А., Гинатулина Л. К., Борисов Ю. М. и др. Исследование кинетики реассоциации ДНК разнохромосомных форм слепушенок (*Ellobius*) в связи с вопросом о путях перестройки хромосом в эволюции.— *Молек. биол.*, 1977, 11.
15. Britten R. J., Graham D. E., Neufeld B. R. Analysis of repeating DNA sequences by reassociation.— In: *Methods in Enzymology/Eds. L. Grossman, K. Moldave*. New York. Acad. Press., 1974, 29, part E.

16. Mizuno S., Macgregor H. C. Chromosomes, DNA sequences and evolution in salamanders of the genus *Plethodon*.— *Chromosoma*, 1974, 48.
17. Narayan R. K. J., Rees H. Nuclear DNA divergence among *Lathyrus* species.— *Chromosoma*, 1977, 63.
18. Гинатулин А. А., Гинатулина Л. К. Структура генома позвоночных.— В кн.: Эволюционные исследования. Владивосток, 1979.
19. Gall J. L., Cohen E. H., Polan M. L. Repetitive DNA sequences in *Drosophila*.— *Chromosoma*, 1971, 33.
20. Hatch F. T., Bodner A. J., Mazrimas J. A., Moore D. H. II. Satellite DNA and cytogenetic evolution. DNA quantity, satellite DNA and karyotypic variations in kangaroo rats (genus *Dipodomys*).— *Chromosoma*, 1976, 58.
21. Brown A. K., Wilmore P. J. Location of repetitious DNA in the chromosomes of the desert locust (*Schistocerca gregaria*).— *Chromosoma*, 1974, 47, 379—383.
22. Shaw D. D. The supernumerary segment system of *Stethophyma*. I. Structural basis.— *Chromosoma*, 1970, 30, 326—343.
23. Shaw D. D., Webb G. C., Wilkinson P. Population cytogenetics of the genus *Caledia* (Orthoptera; Acridinae). II. Variation in the pattern of C-banding.— *Chromosoma*, 1976, 56.

L. V. Vysotskaya, K. F. Tuturova

**REPEATED NUCLEOTIDE SEQUENCES,  
HETEROCHROMATIN AND DNA CONTENT  
IN SOME SPECIES OF GRASSHOPPERS**

Multiple tiny C-bands were revealed within the body of the pachytene chromosomes of four species of the Acrididae as interstitial. The C-bands were not found in the metaphase chromosomes for high level of the chromatin condensation. Similar C-bands were not found in the chromosomes of a species from the family of the Gomphomastacidae. The nuclear DNA amount varies twofold among the species of acridid grasshoppers. However the varieties were found by studying renaturation kinetics to be not connected with the certain fraction increase of nucleotide sequences. There was some increase of all the fractions of nucleotide sequences. The interstitial C-bands involved were supposed to appear as a result of heterochromatinisation of a part of loci arose by tandem duplication.

УДК 612.46.08+612.46/612.647

Л. Г. КНЯЗЬКОВА, Л. Н. ИВАНОВА

**ФОРМИРОВАНИЕ  
КОНЦЕНТРИРУЮЩЕГО МЕХАНИЗМА ПОЧКИ  
ВОДЯНЫХ КРЫС  
В ПРОЦЕССЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ**

Влаголюбивым грызунам: ондатре (*Ondatra zibethica osoyoosensis* Lord), горному бобру (*Aplodontia rufa*), водяной крысе (*Arvicola terrestris* L.), адаптированным в природе к условиям повышенной гидратации, свойственна высокая эффективность выведения воды и особая чувствительность к дегидратирующим воздействиям. Почки этих животных характеризуются значительной редукцией поворотно-противоточной умножительной системы и низкими внутрпочечными градиентами мочевины и натрия [1—4]. В канальцевом аппарате почек влаголюбивых грызунов основное место принадлежит короткопетлистым нефронам, имеющим лишь нисходящую часть тонкого сегмента или совсем лишенных этого отдела. У горного бобра все 100% нефронов короткопетлистые [3], у во-