

А. А. Чилингарян и Е. Ф. Павлов

Количественные изменения содержания ДНК в ядрах эритроцитов крови у межвидовых гибридов птиц и рептилий

(Представлено академиком АН Армянской ССР М. А. Тер-Карапетяном 10. XII 1960)

Одной из современных и пожалуй наиболее убедительных гипотез, объясняющих причины возникновения гетерозиса и повышения жизнеспособности гибридных организмов, является представление о биохимическом обогащении зигот, а в последующем и помесных организмов, развивающихся из них в результате гетерогенного оплодотворения. Однако, несмотря на кажущуюся убедительность этого представления, экспериментальные доказательства, на которых оно основывается, носят преимущественно косвенный характер. Поэтому получение прямых биохимических данных, указывающих как на качественное, так и количественное изменение любых компонентов в зиготе, возникающее в ответ на гетерогенное оплодотворение, представляет определенный интерес.

Наиболее удобным объектом для экспериментальной проверки высказанного соображения среди различных компонентов клетки по нашему представлению являлась дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК).

Во-первых, как это следует из данных Буавена, Р. Вендрели и К. Вендрели (1-4), подтвержденных Мирским и Рисом (5,6), среднее количество ДНК, приходящееся на одно клеточное ядро, в пределах данного вида, для нормальной покоящейся диплоидной соматической клетки является более или менее постоянной величиной.

Во-вторых, содержание ДНК в ядрах, которое по данным Даунса (7) достигает 26%, является достаточным для того, чтобы в случае резких изменений, претерпеваемых ядрами в процессе оплодотворения, отразить в размерах, улавливаемых методами современного анализа, количественные сдвиги этого нуклеопротеида, если таковые возникнут в процессе образования гетерогенной зиготы. В-третьих, наличие относительно простого метода определения ДНК с дифениламиновым реактивом и последующим колориметрированием непосредственно в изолированных ядрах позволяет избежать потерь, неизбежных при выделении в чистом виде этого соединения.

Следующим методическим вопросом, требующим своего разрешения, является выбор источника изолированных ядер. Наиболее отвечающими задаче, поставленной для разрешения в настоящем исследовании, могли бы явиться ядра, выделенные из клеток, лишенных митотической активности. Этому требованию в полной мере отвечают ядра эритроцитов крови птиц и рептилий, так как после выхода в кровеносное русло зрелых форм эритроцитов из кроветворных органов данные клетки утрачивают способность к самостоятельному размножению. Кроме того, сам процесс изоляции ядер из эритроцитов методически значительно проще по сравнению с другими методами, основанными на применении гомогенизаторов с последующим растворением клеточных оболочек и цитоплазматических включений в слабых органических кислотах.

К моменту постановки опытов в нашем распоряжении находились гибриды, полученные от скрещивания между пекинской и мускусной утками с набором хромосом, как это следует из данных Соколовской⁽⁸⁾, равным у обеих форм родительской генерации и гибридов.

Для определения ДНК в ядрах эритроцитов нами было использовано 10 голов чистопородных пекинских и 10 голов мускусных уток, а также 8 голов гибридов, полученных от прямого и реципрокного скрещивания. Изоляция ядер производилась нами по методу, описанному в одной из предыдущих работ⁽⁹⁾. Содержание ДНК в изолированных ядрах определялось по методу Дише. Одновременно с взятием крови, для выделения ядер бралась проба для подсчета форменных элементов с тем, чтобы впоследствии иметь возможность произвести расчеты количества ДНК, приходящейся на одно ядро. Подсчет эритроцитов производился нами по общепринятой методике в камере Горяева. Результаты определений ДНК представлены в табл. 1.

Среднее содержание ДНК в ядрах эритроцитов

Видовая принадлежность уток	Число птиц в группе	Эритроцитов в 1 мм ³ крови	
		среднее	отклонение
Пекинские	10	3.140000	2.580000—3.660000
Мускусные	10	4.061000	3.760000—5.160000
Гибриды	8	3.035000	2.380000—3.640000

Из приведенной таблицы видно, что вес ядер, содержащихся в 1 мл крови, во всех трех группах примерно одинаков и составляет около 3%. Устойчивость этого показателя хорошо гармонирует с данными Соколовской о близости кариотипов гибридных и исходных форм, использованных в данном опыте, и дает основание допустить, что в случае изменений массы ядра, в результате скрещивания, последние

могут быть уловлены при помощи весовых показателей в условиях работы с большим количеством однородных ядер.

Несколько иначе обстоит дело с количеством ДНК, содержащимся в одном мг ядер исходных и гибридных форм. Так, у мускусных и пекинских уток это соединение имеется в ядрах в количестве 24—26%, тогда как у гибридов его содержание увеличивается до 34%, т. е. превышает соответственные показатели родительских форм примерно на одну треть. Такая же картина наблюдается и в случае определения содержания ДНК в одном ядре, проводимая путем пересчета общего содержания ДНК в 1 мл крови на число эритроцитов в том же объеме.

Учитывая, что при проведении отдаленной гибридизации у целого ряда гибридных форм происходят видимые изменения в кариотипе, т. е. наборе хромосом, представлялось интересным проследить за изменением содержания ДНК в ядрах клеток помесных особей, обладающих измененным кариотипом.

В качестве подопытных животных были использованы два подвида, а по данным некоторых авторов возможно и вида (Даревский) скальных ящериц и гибриды между ними. Отцовская форма была представлена *Lacerta saxicola terentijevi Darevsky*, материнская *Lacerta saxicola armeniasa Mehely*. Биологической особенностью формы *Lacerta saxicola armeniasa* является отсутствие взрослых самцов в природе и по данным Даревского⁽¹⁰⁾ этот подвид размножается партеногенетически. Набор хромосом соматических клеток у обоих родительских форм по данным, сообщенным Даревским и Куликовой⁽¹¹⁾, составляет $2n = 36$, а у гибридной формы $2n = 42$. Характеризуя гибриды, возникающие в результате скрещивания вышеназванных подвидов в зонах соприкосновения ареалов их распространения, те же авторы

Таблица 1

мускусных и пекинских уток, а также их гибридов

Вес ядер в 1 мл крови в мг		Содержание ДНК в 1 мг ядер в %		Содержание ДНК в 1 ядре мг · 10 ⁻⁹	
среднее	отклонение	среднее	отклонение	среднее	отклонение
31.61	26.4—34.9	24	14—36	2.37	1.30—3.80
32.70	27.8—38.0	26	16—36	2.09	1.50—2.80
30.40	25.8—33.6	34	28—41	3.40	3.00—4.00

отмечают наличие гетерозиса и отсутствие плодовитости у гибридных форм*.

Таким образом, наличие измененного кариотипа и других особенностей, присущих гибридным формам, указывало на пригодность дан-

* Авторы выражают благодарность И. С. Даревскому за предоставление животных, использованных в настоящих опытах.

ных ящериц в качестве материала для получения изолированных ядер с измененным набором хромозом.

Метод выделения ядер из эритроцитов крови и определение количественного содержания в них ДНК в этой серии опытов оставались теми же, что и при работе с кровью уток. Некоторые отличия заключались в том, что у ящериц кровь бралась непосредственно из сердца после вскрытия грудной полости, а при работе с материнской формой, отличающейся малыми размерами, мы вынуждены были составлять смешанную пробу крови, получая ее от нескольких особей. В этих случаях подсчет эритроцитов также проводился в смешанных пробах.

Результаты определения ДНК в ядрах эритроцитов крови стальных ящериц приводятся в табл. 2.

Среднее содержание ДНК в ядрах эритроцитов

Видовая принадлежность ящериц	Число животн. в группе	Эритроцитов в 1 мм ³ крови	
		среднее	отклонение
L. s. terentijevi (Отцовская форма)	10	1.162.000	999.000 - 1.34000
L. s. armeniaka (Материнская форма)	20	1.162.000	1.100000 - 1.230000
Гибриды	10	1.212.000	1.110000 - 1.320000

Из табл. 2 видно, что вес ядер, содержащихся в 1 мл крови родительских форм ящериц, практически одинаков, в то время как у гибридов он больше на 12—14 мг. Этот факт указывает на правильность выше высказанного предположения о возможности с помощью весового метода уловить отмечаемые при морфоцитологических исследованиях изменения в наборе хромозом и следовательно в общей массе ядра.

Из таблицы также видно, что параллельно с увеличением веса ядер происходит и рост процентного содержания ДНК в единице навески. Причем его увеличение более отчетливо выражено, чем в ядрах уток и достигает примерно 50% по сравнению с исходными родительскими формами. Еще отчетливее нарастание количества ДНК проявляется при пересчете ее на отдельное ядро. В этом случае сравнение гибридных форм с исходными по данному показателю дает увеличение в два с лишним раза.

Сравнивая результаты, полученные в опытах, проведенных на утках, набор хромозом которых не меняется в условиях межвидового скрещивания, с данными определений ДНК в ядрах эритроцитов ящериц, где подобное скрещивание приводит к изменению кариотипа,

не трудно отметить, что в обоих случаях наблюдается увеличение как абсолютного, так и относительного количества ДНК, содержащегося в изолированных ядрах эритроцитов крови. Это нарастание одного из важных компонентов, входящих в основную массу ядра, указывает на то, что в процессе гетерогенного оплодотворения создаются иные условия для синтеза нуклеиновых кислот и по всей вероятности для других ядерных и протоплазматических белков, которые являются биохимической основой для последующего формирования признаков и свойств гибридного организма. Не исключена возможность, что количественное изменение отдельных фракций клеточных белков является в определенной степени выражением и необходимой предпосылкой для становления таких биологических свойств гибри-

Таблица 2

скальных ящериц и их гибридов

Вес ядер в 1 мл крови в мг		Содержание ДНК в 1 мг ядер в %		Содержание ДНК в 1 ядре мг · 10 ⁻⁹	
среднее	отклонение	среднее	отклонение	среднее	отклонение
26.05	23.9—28.2	27	25—29	6.05	6.0—6.10
28.40	25.7—31.1	26	20—32	6.30	5.60—6.60
40.27	36.6—45.8	40	38—42	13.29	11.30—15.10

ных организмов, как повышение резистентности, расширение границ пластичности, мощного развития и др.

Зоологический институт
Академии наук Армянской ССР

Ա. Ն. ԶԻԼԻՆԳՍՐՅԱՆ ԵՎ Ե. Ֆ. ՊԱՎԼՈՎ

**Թույլունների և սողունների միջսեսականից հիբրիդների
արյան կարմիր գնդիկների կորիզի զեղոքսիբրոնուկլեինաթթվի (ԴՆԹ)
քանակային փոփոխությունը**

Ժամանակակից և թերևս ամենահամոզեցուցիչ հիպոթեզներից մեկն հետերոզիսի առաջացումը և հիբրիդների կենսունակության բարձրացումը բացատրում է բեղմնավորված բջիջի բիոքիմիական հաղեցմամբ: Մակայն, այդ համոզիչ թվացող պատկերացման փաստական տվյալները, որոնց վրա նա հիմնված է, կրում են կողմնակի բնույթ: Ուստի այդ տեսակետը փաստարկող բիոքիմիական անմիջական տվյալները (բեղմնավորված բջիջի բաղադրիչ մասերի քանակական և որակական փոփոխությունները) ներկայացնում են որոշակի հետաքրքրություն:

Նպատակահարմար գանվեց ուսումնասիրել հիբրիդային օրգանիզմների արյան կարմիր գնդիկների կորիզի կարևորագույն բաղադրիչից մասերից մեկը՝ զեղոքսիբրոնուկլեինաթթվի (ԴՆԹ) քանակային կազմը: Փորձի տակ են գտնվում պեկինյան և մուսկուսային բազերն ու նրանցից ստացված հիբրիդները, ինչպես և ժայռային մողեսների կրկու ենթատեսակը ու նրանց հիբրիդները:

Բազերի հիբրիդները բրոմոգոմային կոմպլեքսով շէին տարբերվում ծնողական ձևերից, այնինչ ժայռային մոզեսների հիբրիդների բրոմոգոմների քանակը կազմում էր $2\pi = 42$, իսկ ծնողներինը՝ $2\pi = 36$: Աշխատության մեջ շարադրվում է կատարված փորձերի արդյունքները: ԴՆԹ քանակը մեկ մգ կորիզի մեջ պեկինյան և մուսկուսային բազերի մոտ կազմում է $24-26\%$, հիբրիդների մոտ նա բարձրանում է մինչև 36% -ի, այսինքն, համեմատած ծնողական ձևերի հետ վերջինս ավելի է մեկ երրորդով: Նույնանման, դեռ ավելին, այդ երևույթը ցայտուն կերպով արտահայտվում է ժայռային մոզեսների մոտ, բարձրացնելով ԴՆԹ քանակը հիբրիդների մոտ շուրջ 50 տոկոսով:

Այսպիսով համեմատելով ստացված արդյունքները, երկու դեպքում էլ բազերից ստացված հիբրիդային օրգանիզմների մոտ, որտեղ կարիոտիպը նույնանման է և ժայռային մոզեսների հիբրիդների մոտ, որոնց կարիոտիպը փոխվում է՝ նկատվում է արյան կարմիր գնդիկների կորիզի ԴՆԹ բացարձակ և քանակային ավելացում:

Արյան կարմիր գնդիկների կորիզի կարևոր կոմպոնենտներից մեկի փոփոխումը ցույց է տալիս, որ հետերոզեն բեղմնավորման ժամանակ նուկլեինային թթուների, հավանաբար նաև բջիջի մյուս սպիտակուցների համար, ստեղծվում են սինթեզի այլև ուրույն պայմաններ, քան ծնողական ձևերի մոտ:

Հավանական է հիբրիդային օրգանիզմների հետագա զարգացումը պայմանավորված է բջիջային սպիտակուցների քանակային և որակային փոփոխություններով:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ К. Вендрели, Bull. biol. France et Belg., 86, 1, 1952. ² А. Буавен, Р. Вендрели, К. Вендрели, Compt. rend. 226, 106, 1948. ³ Р. Вендрели, К. Вендрели, Experientia 4, 434, 1948. ⁴ Р. Вендрели, К. Вендрели, Experientia 5, 327, 1949. ⁵ А. Е. Мирский, Х. Рус, Nature 163, 666, 1949. ⁶ А. Е. Мирский, Х. Рус, Jour. Gen. Physiol. 34, 451, 1951. ⁷ А. Даунс, Нуклеиновые кислоты, М., 1957. ⁸ И. И. Соколовский, Биологический журнал, т. 4, № 5, 1953. ⁹ А. А. Чилингарян, Е. Ф. Павлов, „Известия АН АрмССР“ (серия биологическая), т. 13, № 1 (1960). ¹⁰ И. С. Даревский, ДАН СССР, т. 122, № 4 (1958). ¹¹ И. С. Даревский, В. Н. Куликова, „Цитология“, № 2, 1961.