АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ГЕНЕТИКА

Том IV

1968

N 6

ГЕНЕТИКА
Том IV, № 6, 1968
Июнь

УДК 576.332

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА НА ЧАСТОТУ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОЙ АНЕУПЛОИДИИ В ООГЕНЕЗЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

СООБЩЕНИЕ IV. ВТОРИЧНОЕ НЕРАСХОЖДЕНИЕ Х-ХРОМОСОМ

Н. В. ГЛОТОВ

Институт медицинской радиологии АМН СССР, Обнинск

ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами было показано [1], что частота анеуплоидии, индуцированной γ-излучением в оогенезе самок XX *Drosophila melanogaster*, не зависит от частоты спонтанной анеуплоидии и структуры генотипа облученных мух. Какими бы ни были спонтанные частоты анеуплоидии (от сотых долей процента до нескольких процентов) и как бы при этом ни была изменена структура генотипа (телоцентрическая или кольцевая конфигурация Х-хромосом, изменение конъюгации хромосом при интерхромосомном эффекте или нарушение ахроматинового веретена), кривые доза — эффект для частот исключительных самок XXY и исключительных самцов XO для разных культур совпадают, если из частот, полученных при облучении, вычесть обнаруженную в данной культуре спонтанную частоту самок XXY или, соответственно, самцов XO. В связи с этим было выдвинуто предположение о том, что повышение частоты анеуплоидии при воздействии ионизирующими излучениями связано не с влиянием облучения на некие специфические механизмы первичного нерасхождения и потери Х-хромосом, но более обще — с влиянием облучения на процесс распределения хромосом к полюсам клеточного деления, на поведение хромосом в мейозе. Для проверки этого предположения в настоящей работе исследуется влияние γ-излучения на процесс вторичного нерасхождения Х-хромосом. По-видимому, можно утверждать, что механизмы спонтанного вторичного нерасхождения хромосом имеют иную природу, чем механизмы спонтанного первичного нерасхождения хромосом. На это указывает прежде всего порядок величин частот первичного и вторичного нерасхождения. «Нормальные» (чаще всего встречающиеся в лабораторных культурах дрозофилы) частоты первичного нерасхождения хромосом составляют сотые — десятые доли процента, повышающиеся в аномальных культурах от нескольких до десяти процентов. «Нормальные» частоты вторичного нерасхождения равны нескольким процентам и повышаются в аномальных культурах до нескольких десятков процентов. Вся совокупность данных о вторичном нерасхождении хромосом за весь период времени исследования этого феномена позволяет сделать вывод о решающей роли конъюгационных отношений между X, X и Y-хромосомами для выбора способа распределения их к противоположным полюсам в мейозе [2—4].

Чисто формальное, экспериментально обоснованное определение понятий нерасхождения и потери хромосом [5], данное для первичных процессов (у самок XX), позволяет распространить его и на вторичное нерасхождение хромосом (у самок XXY). Для того чтобы сделать сравнимыми полученные результаты, целесообразно распространить на вторичное нерас-

хождение и способы вычисления частот исключительных самок (оценка частоты нерасхождения хромосом) и исключительных самцов (оценка суммы частот нерасхождения и потери хромосом) [6].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Эксперименты проводили с самками XXY двух генотипов XXY: $ca^{nd}/+$ и $y/y\ sc^{S1}$ In 49 v sc^{8}/Y.

Самки XXY; $ca^{nd}/+$ были получены как исключительное потомство в скрещивании самок ca^{nd} с самцами Bar. Спонтанные частоты исключительного потомства в этой культуре были следующими: исключительные самки — 3,9%, исключительные самцы — 3,4%. Избранный способ получения исходного материала приводил к неслучайным вариациям частоты исключительных мух, поэтому дальнейший анализ проведен с учетом разниц между результатами трех повторных опытов.

Самки $y/y\ sc^{S1}$ In 49 v sc^{8}/Y были получены как исключительное потомство в скрещивании $y/y\ sc^{S1}$ In 49 v sc^{8}; $Cy/+$ самок с самцами Berlin wild. До начала этих экспериментов самок $y/y\ sc^{S1}$ In 49 v sc^{8}/Y в течение примерно десяти поколений скрещивали с самцами Berlin wild. Спонтанные частоты исключительных самок в этом случае составили 35,0 и самцов — 37,1%.

Как и в предыдущих экспериментах [6], двухдневных самок XXY; $ca^{nd}/+$ и $y/y\ sc^{S1}$ In 49 v sc^{8}/Y облучали γ-лучами Co^{60} в дозах 1, 2, 3, 4 и 5 *кр* при мощности дозы ~70 *р/сек* и тотчас после облучения индивидуально скрещивали с самцами Bar и Berlin wild, соответственно. Учитывали потомство от яйцекладки первых трех дней. В отличие от предыдущих опытов, не было необходимости анализировать исключительное потомство. Методы статистического анализа также были прежними [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты опытов с самками XXY$ca^{nd}/+$ приведены в табл. 1 и на рис. 1. Поскольку была заметной разница между спонтанными частотами исключительных мух в повторных опытах, анализ кривых доза — эффект

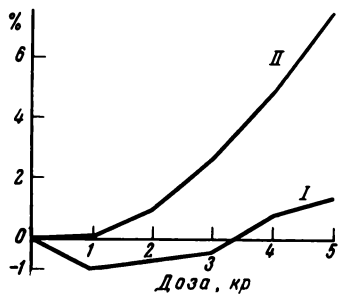

Рис. 1. Облучение самок XXY; $ca^{nd}/+$. Кривые доза — эффект (при вычитании контроля) для частот исключительных самок (*I*) и самцов (*II*)

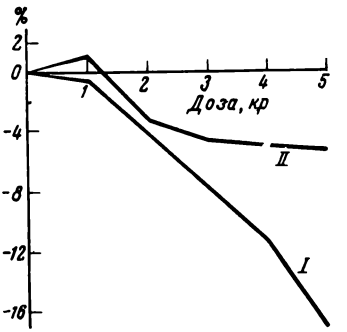

Рис. 2. Облучение самок $y/y\ sc^{S1}$ In 49 v sc^{8}/Y. Кривые доза — эффект (при вычитании контроля) для частот исключительных самок (*I*) и самцов (*II*)

проводили по повторностям путем перехода к дисперсионному анализу в схеме Армитеджа [7]. Неслучайные колебания спонтанных частот вторичного нерасхождения хромосом наблюдали многие авторы; в последнее время этот вопрос обсуждался Шпилером [8]. В табл. 2 представлены результаты дисперсионного анализа кривых доза — эффект. Видно, что при достоверной разнице между повторными опытами частота исключительных самок изменяется с дозой недостоверно (как и для самок ca^{nd} [1]), частота же исключительных самцов статистически достоверно растет с дозой примерно до 10%. Сравнение этих результатов с полученными на-

Таблица 1

Результаты скрещивания самок XXY, $ca^{nd}/+$, облученных разными дозами гамма-лучей, с самцами Bar

Доза, *кр*	Регулярные		Исключительные			
			самки		самцы	
	самки	самцы	число	%	число	%
0	2578	2586	104	3,9	92	3,4
1	1420	1446	43	2,9	51	3,5
3	1182	1023	39	3,2	54	4,4
2	1286	1181	47	3,5	83	6,1
4	749	658	37	4,7	68	8,3
5	486	425	27	5,3	57	10,5

Таблица 2

Результаты дисперсионного анализа кривых доза — эффект для самок XXV, $ca^{nd}/+$

Рассеяние	Суммы квадратов	Число степеней свободы	Среднее значение квадратов	Отношение дисперсий	*p*
Частоты исключительных самок					
Повторности	0,6014	2	0,3007	8,42	<0,001
Дозы	0,3334	5	0,0667	1,87	0,1
в том числе связанное с линейностью	0,0758	1	0,0758	2,12	>0,1
с отклонением от линейности	0,2576	4	0,0644	1,80	>0,1
Остаточное	285,0364	7 990	0,0357	—	—
Итого	285,9712	7 997	—	—	—
Частоты исключительных самцов					
Повторности	0,3273	2	0,1636	3,44	<0,05
Дозы	3,7388	5	0,7478	15,71	<0,001
в том числе связанное с линейностью	3,3025	1	3,3025	69,80	≪0,001
с отклонением от линейности	0,4363	4	0,1091	2,30	>0,05
Остаточное	380,7001	7 998	0,0476	—	—
Итого	384,7662	8 105	—	—	—

ми ранее для самок XX четырех генотипов свидетельствует о их хорошем совпадении. Таким образом, на основании результатов, полученных для самок XXY, $ca^{nd}/+$, можно заключить, что выдвинутое предположение о влиянии изучения на распределение хромосом в мейозе, а не на специфические механизмы первичного нерасхождения подтвердилось.

В табл. 3 и на рис. 2 приведены результаты опытов с самками y/y sc^{SI} In 49 v sc^{8}/Y. Сразу же бросается в глаза очевидное противоречие со всей совокупностью предыдущих опытов: с увеличением дозы частота исключительных самок уменьшается примерно на 17% (в то время как во всех предыдущих культурах имела место тенденция к уве-

личению частоты максимально на 1%); частота исключительных самцов также уменьшается с увеличением дозы, но лишь примерно на 5% (во всех предыдущих опытах наблюдалось выраженное увеличение частоты примерно на 10%). При этом своеобразный эффект облучения здесь

Таблица 3

Результаты скрещивания самок y/y sc^{SI} In 49 v sc^{8}/Y, облученных разными дозами гамма-лучей, с самцами Berlin wild

Доза, кр	Регулярные			Исключительные				Воспроизводимость частот исключительных мух в повторных опытах, p	
	самки	самцы yellow		самки		самцы			
		v	+	число	%	число	%	самки	самцы
0	2059	832	1092	1110	35,0	1217	37,1	>0,1	>0,999
1	1899	732	894	996	34,4	1172	38,2	>0,3	>0,9
2	1914	792	910	855	30,9	987	34,0	>0,05	>0,6
3	1256	499	617	473	27,4	609	32,6	>0,7	>0,6
4	1011	382	434	311	23,5	483	32,3	>0,4	0,6
5	607	223	262	131	17,8	284	31,9	>0,1	>0,7

статистически высоко достоверен. Частота исключительных самок падает с увеличением дозы ($p < 10^{-10}$) в основном за счет линейной компоненты ($p < 10^{-10}$), для нелинейности $p > 0{,}05$. Частота исключительных самцов также достоверно снижается с увеличением дозы ($p < 10^{-5}$), для линейного члена $p < 10^{-4}$, для нелинейных $p > 0{,}1$.

Прежде чем давать объяснение полученным результатам, необходимо убедиться в их достоверности, в отсутствии систематических методических ошибок. Во-первых, отметим хорошую воспроизводимость результатов в трех повторных опытах (см. табл. 3). Поскольку скрещивания были индивидуальными, оказалось возможным провести группировку семей по количеству потомства в F_1 (уменьшающемуся, естественно, с дозой). Для каждой дозы была показана независимость частоты исключительных мух от численности потомства в пробирке. Во-вторых, нами была сделана попытка изменить схему эксперимента, чтобы независимым образом подтвердить наблюдаемый эффект. Для самых разнообразных радиобиологических реакций хорошо известно, что чем больше промежуток времени между облучением и регистрацией эффекта, тем ближе регистрируемый показатель к своему контрольному значению. В отношении первичного нерасхождения и потери хромосом это было недавно вновь показано на большом материале Тихомировой [9]. В данное время нам принципиально совершенно неважно, каков механизм аналогичного эффекта в отношении нерасхождения хромосом — будь то пострадиационное восстановление, дифференциальная радиочувствительность, селекция или просто регенеративные процессы. Важно лишь, что с этой общей точки зрения можно ожидать следующего результата: если при облучении частота исключительных мух уменьшается, то чем дальше время яйцекладки отстоит от момента облучения, тем выше (и ближе к контролю) должна быть частота исключительных мух. Результаты такого опыта представлены в табл. 4, а результаты его дисперсионного анализа в табл. 5. Скрещивания были индивидуальными, каждая облученная (или контрольная) самка через три дня (1—3) после облучения переносилась на свежий корм на два дня (4—5), затем снова на свежий корм на два дня (6—7) и т. д. Для анализа было взято лишь потомство самок, давших культуру во всех

пяти последовательных кладках (в контроле 18 самок, при облучении 3 *кр* — 58). Такая постановка опыта позволила обнаружить статистически достоверные разницы между повторностями и четче выявить при облучении систематический рост частоты исключительных самок в после-

Таблица 4

Частота исключительного потомства у самок y/y sc^{SI} In 49 v sc^{8}/Y в последовательных кладках после облучения, %

Исключительные мухи, %	Вариант опыта	Время яйцекладки, дни				
		1—3	4—5	6—7	8—9	10—11
Самки	Контроль	38,0 (218/574)	36,5 (182/499)	41,9 (184/439)	41,3 (203/491)	42,3 (216/511)
	3 *кр*	24,1 (177/733)	32,1 (358/1,115)	32,1 (362/1129)	31,4 (409/1301)	37,1 (435/1173)
Самцы	Контроль	40,4 (241/597)	44,0 (249/566)	45,2 (210/465)	44,9 (235/523)	43,8 (230/525)
	3 *кр*	32,7 (270/926)	37,9 (462/1219)	35,4 (420/1187)	32,6 (433/1326)	37,1 (442/1190)

довательных кладках; частота исключительных самцов во времени меняется нелинейно. Таким образом, воспроизводимость результатов повторных опытов, с одной стороны, и характерные кривые время — эффект, с другой, позволяют исключить предположение о возможных методических ошибках, которые искажают кривые доза — эффект.

Перейдем теперь к обсуждению полученных результатов. Представляется маловероятным, что необычный вид последней кривой доза — эффект связан со структурой генотипа самок y/y sc^{SI} In 49 v sc^{8}/Y. В самом деле,

Таблица 5

Результаты дисперсионного анализа кривых время — эффект для самок y/y sc^{SI} In 49 v sc^{8}/Y
Приведены только полученные значения *p*

Рассеяние	Исключительные			
	самки		самцы	
	контроль	3 *кр*	контроль	3 *кр*
Повторности	$<0{,}01$	$<0{,}01$	$>0{,}05$	$<0{,}001$
Время	0,2	$<0{,}01$	$F<1$	$<0{,}05$
в том числе связанное с линейностью	0,05	$\ll 0{,}001$	$F<1$	$F<1$
с отклонением от линейности	$F<1$	0,01	$F<1$	$<0{,}01$

в случае первичного нерасхождения Х-хромосом мы изменяли конфигурацию Х-хромосом, конъюгацию хромосом и ахроматиновое веретено — и тем не менее получили одинаковые результаты. Далее, переход к рассмотрению совсем другого процесса — вторичного нерасхождения Х-хромосом

(самки, XXY, $ca^{nd}/+$) — дал принципиально тот же результат. Поэтому трудно допустить, что введение в систему XXY одной инвертированной Х-хромосомы столь резко изменит природу взаимодействия излучения с хромосомами, так сильно повлияет на их поведение в мейозе. Однако шесть культур дрозофилы, с которыми мы работали, отличаются друг от друга не только структурой генотипа, но и спонтанными частотами исключительных мух. Именно с этой точки зрения последняя культура — самки $y/y\ sc^{sl}$ In 49 v sc^{8}/Y резко выделяется среди всех остальных: она дает спонтанно более трети исключительных мух (35%), в то время как все остальные — лишь от сотых долей процента до нескольких процентов (0,03—3,9%). Поэтому нам представляется более правдоподобным другое предположение, которое можно привести, по крайней мере, для объяснения изменения с дозой частот исключительных самок (оценка частоты нерасхождения хромосом).

Если допустить, что при облучении протекают два противоположно направленных процесса: один — повышающий частоту нерасхождения, а другой — «запрещающий» некоторым клеткам нерасхождение хромосом, т. е. понижающий частоту нерасхождения, то для выхода суммарной регистрируемой реакции могут оказаться очень существенными разницы между частотами спонтанной анеуплоидии (35% резко отличаются как от $\sim 4\%$, так и от 0,03%). Действительно, если процесс, снижающий частоту нерасхождения, значительно преобладает над процессом, повышающим ее, то экспериментально обнаружить снижающую компоненту будет почти так же трудно на фоне 4%, как и 0,03%, и она может резко проявиться на фоне спонтанной частоты, равной 35%. Следует заметить, что факторы, которые могут снижать регистрируемую частоту нерасхождения хромосом при облучении, существуют. Это хромосомные аберрации, порядок величин которых при применяемых дозах облучения грубо можно оценить в десятках процентов. Если одна из Х-хромосом в клетке повреждена и в дальнейшем элиминируется, это означает, что данная клетка не может дать нерасхождения хромосом. Более того, если регистрация эффекта нерасхождения ведется генетическим методом по одному локусу (например, yellow), то уже любая делеция, включающая ген yellow, методически будет равнозначна «потере» данной хромосомы и, стало быть, невозможности в этом случае обнаружить нерасхождение хромосом. Таким образом, качественно предлагаемое объяснение сводится к следующему. При облучении наряду с факторами, увеличивающими частоту исключительных самок, существуют факторы, снижающие частоту появления исключительных самок, что при достаточно больших спонтанных частотах может приводить к снижению регистрируемого суммарного эффекта с возрастанием дозы. Мы полагаем, что радиационно-индуцированные частоты исключительных самок одинаковы во всех культурах и определяются только дозой облучения. Регистрируемые же частоты вследствие наличия процесса, снижающего частоту нерасхождения,— явление вторичное и зависят от спонтанной частоты исключительных самок.

В следующем сообщении будет сформулирована количественная гипотеза и сопоставлены ожидаемые на ее основе результаты с экспериментальными данными.

ВЫВОДЫ

Представлены кривые доза — эффект для частот исключительных мух в потомстве самок XXY; $ca^{nd}/+$ и y/sc^{sl} In 49 v sc^{8}/Y. При низкой частоте вторичного нерасхождения Х-хромосом ($\sim 4\%$) кривые для исключительных самцов и самок совпадают при вычитании контроля с кривыми,

полученными ранее для самок XX четырех разных генотипов [3]. При высокой частоте вторичного нерасхождения (~35%) частота исключительных мух уменьшается с увеличением дозы облучения. Анализ этого эксперимента приводит к заключению о наличии при облучении двух противоположных процессов. С одной стороны, ионизирующие излучения индуцируют нерасхождение хромосом, а с другой — возникающие при облучении хромосомные аберрации приводят к уменьшению частоты исключительных самок.

Таблиц — 5, иллюстраций — 2, библиография — 9 назв.

Поступила в редакцию
24 мая 1967 г.

Литература

1. Н. В. Глотов. Влияние генотипа на частоту радиационно-индуцированной анеуплоидии в оогенезе *Drosophila melanogaster*. III. Claret-non-disjunctional. Генетика, 4, № 4, 1968.
2. T. H. Morgan, C. B. Bridges, A. H. Sturtevant. The genetics of *Drosophila*. Bibliographia genetica, 2, 1, 1925.
3. K. W. Cooper. A new theory of secondary non-disjunction in female *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 34, 179, 1948.
4. T. Oksala. Chromosome pairing, crossing over, and segregation in meiosis in *Drosophila melanogaster* females. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 23, 197, 1958.
5. Н. П. Бочков, Н. В. Глотов. Анеуплоидия, возникающая в мейозе у животных и человека. Генетика, № 3, 171, 1967.
6. Н. В. Глотов, А. Г. Сушкин. Влияние генотипа на частоту радиационно-индуцированной анеуплоидии в оогенезе *Drosophila melanogaster*. I. Кольцевая Х-хромосома. Генетика, № 8, 60, 1967.
7. P. Armitage. Tests for linear trends in proportions and frequencies. Biometrica, 11, 375, 1955.
8. R. A. Spieler. Genic control of chromosome loss and non-disjunction in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 48, 73, 1963.
9. М. М. Тихомирова. Сравнительное изучение радиочувствительности различных стадий оогенеза. Генетика, № 6, 24, 1967.

THE INFLUENCE OF THE GENOTYPE ON THE FREQUENCY OF RADIATION-INDUCED ANEUPLOIDY IN THE OOGENESIS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

IV. SECONDARY NON-DISJUNCTION OF X-CHROMOSOMES

N. W. GLOTOFF

Institute of Medical Radiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Obninsk

Summary

Dose-response curves are presented (within the range from 1 to 5 *kr* of Co^{60} γ-rays) for XXY-females of two genotypes. In the progeny of XXY; ca^{nd} / + females spontaneous frequency of exceptional flies was 3,9 per cent for females and 3,4 per cent for males. Their frequency in the progeny of y / y sc^{S1} In 49 x sc^{8} / Y females was 35,0 and 37,1 per cent respectively. The dose-response curves for the frequencies of exceptional progeny in XXY; ca^{nd} / + did not differ from the earlier obtained curves for XX-females [1]. The curves obtained in the irradiation experiments with y / y sc^{S1} In 49 v sc^{8} / Y exhibited an unusual slope: with the increasing dose the frequency of exceptional flies decreased (fig. 2). It is assumed that the difference observed between the dose-response curves are associated with the differences in the spontaneous frequencies of the chromosome non-disjunction, due to the two oppositely directed processes induced by irradiation, viz. the one «prohibiting» the non-disjunction (apparently chromosome aberrations) and the other one inducing it.