

## МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИЦЕНТРОМЕРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА ХРОМОСОМ ТРОФОЦИТОВ ЯИЧНИКОВ У ВИДОВ ПОДГРУППЫ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© К. Е. Усов, Т. А. Шелковникова,<sup>1</sup> И. Э. Вассерлауф, В. Н. Стегний

Научно-исследовательский институт биологии  
и биофизики Томского государственного университета;  
<sup>1</sup> электронный адрес: gene@res.tsu.ru

При помощи метода микродиссекции политенных хромосом была получена районспецифичная мини-библиотека ДНК хромоцентра трофоцитов *Drosophila orena* и проведена флуоресцентная гибридизация *in situ* полученной пробы на хромосомы трофоцитов яичников видов подгруппы *Drosophila melanogaster*. Последовательности, гомологичные последовательностям районспецифичной пробы, на хромосомах трофоцитов были обнаружены у *D. orena* в хромоцентре, объединяющем прицентромерные районы всех хромосом, у остальных видов подгруппы *D. melanogaster* — в прицентромерных районах всех хромосомных плеч с некоторыми исключениями. Так, у *D. simulans* одно из плеч хромосомы 2 не содержит сигнала; у *D. erecta* последовательности хромоцентра были обнаружены в прителомерном районе одного из плеч хромосомы 3; у *D. yakuba*, *D. santomea* и *D. teissieri* мечение обнаружено в районах, прилегающих к плотным ярко окрашивающимся DAPI прицентромерным блокам гетерохроматина хромосом 2 и 3. На стадии S<sub>6</sub> (вторичное ретикулярное ядро) у *D. orena* меченый хроматин выявляется преимущественно в пределах определенной территории, его распределения по всему ядру не происходит. У других видов подгруппы, напротив, на этой стадии меченая ДНК распределена в ядре диффузно.

Ключевые слова: подгруппа *Drosophila melanogaster*, политенные хромосомы трофоцитов яичников, прицентромерный гетерохроматин, микродиссекция хромосом, FISH-анализ.

Принятые сокращения: ПЦР — полимеразная цепная реакция, DAPI — 4,6-diamidino-2-phenyl-indole, DOP-PCR — ПЦР с частично вырожденным праймером, FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ* (от англ. fluorescent *in situ* hybridization).

Эволюционные взаимоотношения видов подгруппы *Drosophila melanogaster* интенсивно изучаются на протяжении нескольких десятилетий, однако по-прежнему существует множество проблем в филогении этих видов, особенно спорным моментом являются филогенетические взаимоотношения между гомосеквентными видами *D. simulans*, *D. mauritiana* и *D. sechellia*. До сих пор нет однозначного ответа на вопрос: какой вид является исходным для всей подгруппы *D. melanogaster*?

Многочисленные исследования с использованием разнообразных подходов, таких как анализ политенных хромосом (Lemeunier, Ashburner, 1976, 1984) и репродуктивной изоляции (Lachaise et al., 1986), изучение последовательностей митохондриальной и ядерной ДНК (Cassone et al., 1996) и эволюции паттернов генной экспрессии (Bonneton, Wegnez, 1995), исследование аллозимной изменчивости методом двухмерного электрофореза (Matsuo et al., 1999), анализ молекулярной эволюции последовательностей ДНК (Takano-Shimizu, 1999, 2000), изучение вертикального и горизонтального переносов мобильных генетических элементов (Gentile et al., 2001) и многих других методических приемов, не позволили прийти к единой схеме филогении в данной подгруппе, в частности относительно расположения пар видов *D. yakuba*—*D. teis-*

*sieri* и *D. erecta*—*D. orena* по отношению к комплексу «*melanogaster*».

С открытием нового вида *D. santomea* филогенетическое древо происхождения видов подгруппы *D. melanogaster* — было дополнено. По последовательностям цитохрома *b* была выявлена общность происхождения *D. santomea*, *D. yakuba* и *D. teissieri* (Lachaise et al., 2000).

Используя комплексный подход, основанный на более чем десяти независимых показателях, Доувер с соавторами (1986) и затем О'Грэди с соавторами (O'Grady et al., 2001) предложили схему филогении подгруппы *D. melanogaster*, согласно которой *D. orena* является филогенетически исходным видом не только для комплекса «*yakuba*», но и для всей подгруппы. Позднее была предложена сходная схема эволюционных взаимоотношений внутри подгруппы *D. melanogaster* на основе анализа полиморфизма ретроэлемента МДГ4 (Саленко, 2007). Эти данные согласуются с результатами, полученными нами ранее на основе изучения ориентации хромосом в ядрах трофоцитов яичников у восьми близкородственных видов подгруппы *D. melanogaster* (Вассерлауф, Стегний, 1992; Стегний, Вассерлауф, 1994). Нами также было обнаружено, что *D. orena*, которая является видом-реликтом и занимает эндемичный ареал в высокогорье Камеруна (Le-

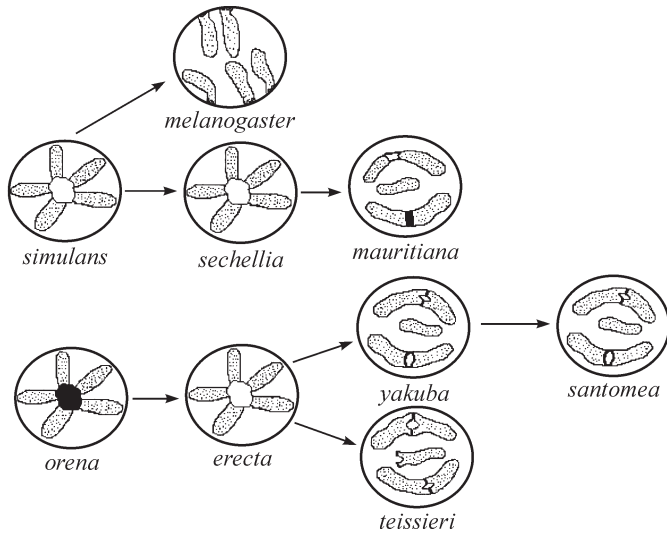


Рис. 1. Схема взаиморасположения хромосом в ядрах трофоцитов яичников в подгруппе *Drosophila melanogaster* (по: Стегний, Вассерлауф, 1994, с уточнением для *D. teissieri* и дополнением для *D. santomea*).

meunier, Ashburner, 1984), отличается от всех остальных видов хромоцентральной организацией первичных политенных хромосом в ядрах трофоцитов яичников, причем хромоцентр содержит два крупных гетерохроматических блока. По-видимому, такая архитектура ядра связана с большим количеством гетерохроматина. Известно, что *D. orena* — единственный вид подгруппы, кариотип которого содержит метацентрические — X- и Y-хромосомы, причем XR-плечо и метацентрическая Y-хромосома полностью гетерохроматизированы (Lemeunier et al., 1978).

Из предложенной нами межвидовой схемы взаимного расположения хромосом трофоцитов яичников видов подгруппы *D. melanogaster* (рис. 1; Стегний, Вассерлауф, 1994), следует, что архитектура ядер трофоцитов эволюционировала от локального хромоцентра (*D. orena*) к диффузному (*D. simulans*, *D. sechellia* и *D. erecta*), затем к полному его исчезновению (*D. mauritiana*, *D. yakuba* и *D. teissieri*) и, наконец, к прикреплению прицентромерных или теломерных районов хромосом к оболочке ядра (*D. melanogaster*).

Известно, что гетерохроматин играет важную роль в организации трехмерной структуры интерфазного ядра — обеспечивает межхромосомные взаимодействия на основе эктопической конъюгации и реализует связь хромосом с оболочкой ядра (хромосомно-мембранные взаимоотношения). С изменением количества гетерохроматина и его межхромосомным перераспределением может измениться ориентация хромосом в ядре, что повысит вероятность возникновения системной мутации, которая играет решающую роль в процессе видообразования (Стегний, 1993).

Целью настоящей работы было изучение распределения последовательностей ДНК, выделенных из гетерохроматина хромоцентра трофоцитов яичников *D. orena*, у близкородственных видов подгруппы *Drosophila melanogaster*.

Следует отметить, что трофоциты яичников *Drosophila* как объект удобны тем, что имеют политенные хромосомы, хотя и не принадлежащие к классическому типу, однако вполне пригодные для анализа, что существенно

облегчило нашу задачу. Кроме того, в ядрах трофоцитов в отличие от соматических тканей (например, слюнных желез) прицентромерный гетерохроматин реплицируется в гораздо большей степени (Mal'ceva, Zhimulev, 1993).

## Материал и методика

Виды рода *Drosophila*. В данной работе были использованы следующие виды подгруппы *Drosophila melanogaster*: комплекс «yakuba» — *D. teissieri*, *D. yakuba* и *D. erecta* (получены из Tucson Stock Center, Аризона, США), *D. santomea* и *D. orena* (любезно предоставлены F. Lemeunier, Laboratoire Populations, Génétique et Evolution, Gif-sur-Yvette, Франция); комплекс «melanogaster» — *D. melanogaster* (линия Canton S), *D. simulans*, *D. mauritiana* и *D. sechellia* (получены из Tucson Stock Center, Аризона, США).

Цитологические препараты. Для приготовления препаратов политенных хромосом для микродиссекции и гибридизации *in situ* использовали яичники самок в возрасте 1.0—1.5 сут. Яичники выделяли в 0.7%-ном растворе NaCl и фиксировали в упрощенном растворе Карнуа (этанол и ледяная уксусная кислота, 3 : 1). Затем яичники инкубировали в 45%-ной уксусной кислоте в течение 5 мин, накрывали покровным стеклом и раздавливали. Препараты замораживали в жидком азоте, затем обезвоживали в спиртах (этанол) возрастающей концентрации (50 % — при  $-20^{\circ}\text{C}$  5 мин; 70 и 100 % — при  $4^{\circ}\text{C}$  по 5 мин), инкубировали в растворе Карнуа при  $4^{\circ}\text{C}$  5 мин, высушивали на воздухе в течение 5 мин, ополаскивали в 100%-ном спирте и снова высушивали. Препараты для микродиссекции готовили на покровных стеклах (60 × 24 мм). После раздавливания и заморозки, как описано выше, препараты хранили в 70%-ном этаноле при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Давленные лактоацетоорсеиновые препараты готовили по стандартной методике (Стегний, 1979).

Микродиссекция хромосом и амплификация хромосомной ДНК. Для получения набора фрагментов ДНК из хромоцентра политенных хромосом ядер трофоцитов яичников *D. orena* использовали метод микродиссекции. Были вырезаны четыре хромоцентра с двух препаратов политенных хромосом трофоцитов яичников *D. orena* (рис. 2).

Микродиссекцию проводили с помощью микроскопа AXIOVERT 10, оснащенного микроманипулятором MRmot (Zeiss, ФРГ) и механическим позиционером, в стерильных условиях специально приготовленными для этого микродиссекционными иглами. Диссектированный материал переносили в микрокаплю (20—40 нл) раствора протеиназы К, помещенную в силиконизированную микропипетку. Дальнейшую обработку диссектированного материала проводили, как описано ранее (Рубцов и др., 1999).

Флуоресцентная гибридизация *in situ*. Амплифицированную в ходе DOP-PCR смесь фрагментов ДНК диссектированных районов хромосом использовали в качестве зонда для проведения флуоресцентной гибридизации *in situ* на хромосомы трофоцитов яичников видов подгруппы. Введение метки в ДНК микродиссекционных ДНК-библиотек осуществляли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Детекцию пробы проводили при помощи Anti-Digoxigenin-Rhodamine. Хромосомы затем окрашивали DAPI и заключали в антифэйд на основе

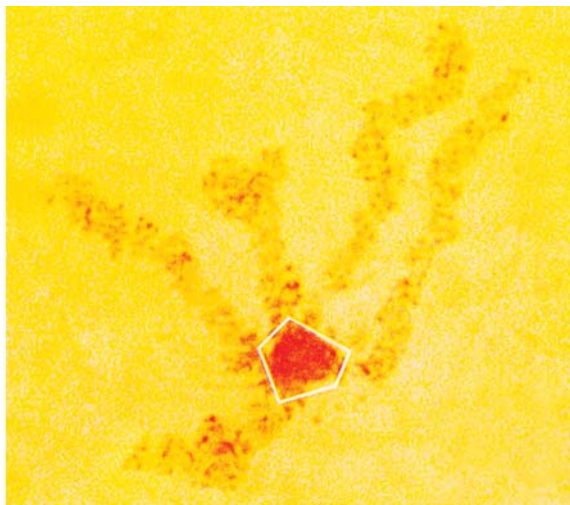


Рис. 2. Хромосомы из питающей клетки яичника *Drosophila orena*.

Район микродиссекции выделен рамкой. Окрашивание лактоацетоорсеином.

ДАВСО. Определение районов включения зонда определяли сравнением хромосом с включенной меткой с окрашенными лактоацетоорсеином политенными хромосомами на соответствующей стадии. По каждому виду было проанализировано 3—5 препаратов, по 10 ядер на каждом препарате. Локализацию пробы оценивали в хромосомах XL, 2 и 3, точечную хромосому 4 не учитывали в связи с малым размером и сложностью ее визуализации в ядрах трофоцитов.

Анализ и регистрацию результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss AxioImager

Z.1 (Zeiss, Германия), CCD-камеры AxioCam и программного обеспечения Axio Vision LE Rel. 4.5.

Реактивы: рибонуклеаза А (RNA-ase А), пепсин А (pepsin А), параформальдегид, формамид, декстрансульфат, спермальная ДНК лосося, DAPI, Tween 20 и DABCO (1,4-дизабицикло-2,2,2-октан; Sigma, США); anti-digoxigenin-rhodamine (Fab-fragment, digoxigenin-11-dUTP; Roche, США); протеиназа К (Boehringer Mannheim, Германия); Ampli Taq ДНК-полимераза, Трис-HCl, DOP-праймер, дНТФ и MgCl<sub>2</sub> (Медиген, Новосибирск).

## Результаты и обсуждение

В результате микродиссекции и DOP-PCR была получена смесь фрагментов ДНК (мини-библиотека) гетерохроматина хромоцентра из трофоцитов (питающих клеток) яичников *D. orena*. Затем этот материал был использован в качестве зонда для гибридизации с политенными хромосомами трофоцитов яичников видов *D. orena*, *D. teissieri*, *D. yakuba*, *D. santomea*, *D. erecta*, *D. melanogaster* (линия Canton S), *D. simulans*, *D. mauritiana* и *D. sechellia*.

Для анализа был выбран один морфологический тип политенных хромосом трофоцитов яичников — тонкие удлиненные хромосомы на стадии S<sub>4</sub>—G<sub>5</sub>, морфология которых отражает видовую специфику (Стегний, Вассерлауф, 1994). Кроме того, было проанализировано распределение меченого хроматина на стадии распада политенных хромосом — S<sub>6</sub>, на этой стадии хроматин диффузно распределен в объеме ядра.

Изучение локализации пробы на хромосомах питающих клеток яичников 9 видов подгруппы *D. melanogaster* показало следующее: в комплексе «*yakuba*» у *D. orena* последовательности, гомологичные последовательностям мини-библиотеки, помимо хромоцентра были обна-

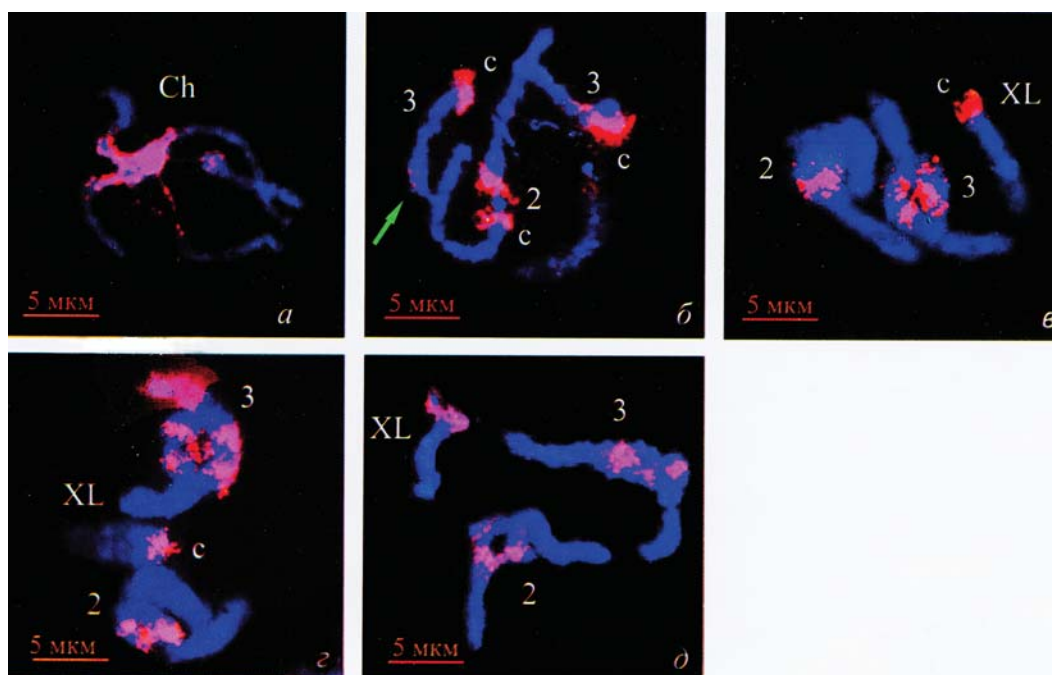


Рис. 3. FISH-гибридизация ДНК-пробы из хромоцентра *Drosophila orena* на политенные хромосомы трофоцитов видов комплекса «*yakuba*» на стадии эндоцикла S<sub>4</sub>—G<sub>5</sub>.

*a*—*D. orena*, *б*—*D. erecta*, *в*—*D. teissieri*, *г*—*D. yakuba*, *д*—*D. santomea*. 2, 3 — хромосомы 2 и 3 соответственно; XL — левое плечо X-хромосомы; Ch — хромоцентр; с — центромерный район. Синий псевдоцвет — DAPI, красный псевдоцвет — библиотека ДНК из хромоцентра трофоцитов яичников *D. orena*. Стрелкой указана локализация пробы в теломерном районе хромосомы 3 *D. erecta*.



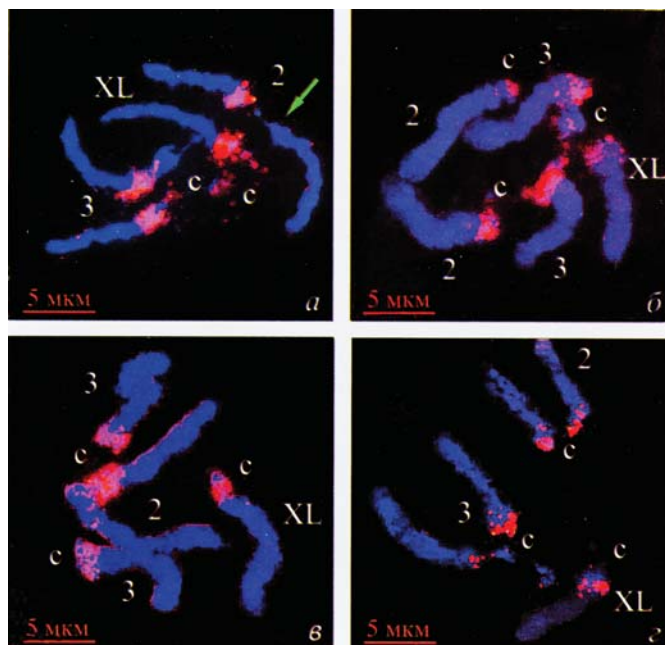


Рис. 4. FISH-гибридизация ДНК-пробы из хромоцентра *Drosophila orena* на политенные хромосомы трофоцитов видов комплекса «*melanogaster*» на стадии эндоцикла  $S_4$ — $G_5$ .

*a* — *D. simulans*, *б* — *D. sechellia*, *в* — *D. mauritiana*, *г* — *D. melanogaster*. Стрелкой указано отсутствие сигнала на хромосоме 2 *D. simulans*; остальные обозначения те же, что и на рис. 3.

ружены в составе прицентромерных районов всех хромосомных плеч (рис. 3, *a*). В интеркалярных районах хромосомных плеч не было выявлено гомологии с последовательностями зонда. У *D. erecta* кроме прицентромерных районов последовательности хромоцентра присутствуют в субтеломерном районе хромосомы 3 (рис. 3, *б*). *D. teissieri*, *D. yakuba* и *D. santomea* имеют сходную морфологию хромосом трофоцитов, у всех этих видов сигнал обнаружен в прицентромерном районе X-хромосомы, в районах, прилегающих к плотным, ярко окрашивающимся как лактоацетоорсеином, так и DAPI блокам прицентромерного гетерохроматина хромосом 2 и 3, причем на хромосоме 3 обнаружены два участка интенсивного мечения — с каждой стороны от блока, а на хромосоме 2 — один такой участок (рис. 3, *в*—*д*).

В комплексе «*melanogaster*» у *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* и *D. sechellia* последовательности хромоцентра *D. orena* были обнаружены в основ-

ном в составе прицентромерных районов хромосомных плеч, однако наблюдались некоторые различия в локализации пробы (рис. 4, *a*—*г*). Так, у *D. simulans* сигнал не был обнаружен на одном из плеч хромосомы 2 (рис. 4, *a*).

Стадия эндоцикла  $S_6$ . У всех изученных видов, кроме *D. orena*, отмечено диффузное распределение пробы в пространстве ядра (на рис. 5, *a* в качестве примера приведено ядро трофоцита *D. mauritiana*). У *D. orena* в отличие от всех остальных видов на этой стадии меченый хроматин выявляется преимущественно в пределах локальной территории (рис. 5, *б*).

Виды-сиблинги подгруппы *D. melanogaster* слишком близки для эволюционных исследований эухроматиновых генов, так как состав эухроматина остается относительно стабильным на протяжении длительного времени, поэтому обычно такие исследования проводятся на более отдаленных видах, например *D. virilis*, *D. pseudoobscura* и

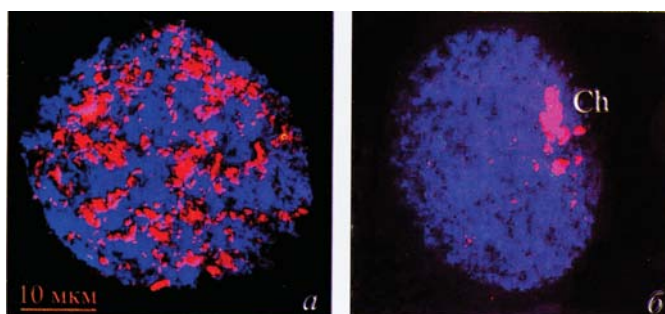


Рис. 5. FISH-гибридизация ДНК-пробы из хромоцентра *Drosophila orena* на хроматин ядер трофоцитов на стадии эндоцикла  $S_6$  у видов *D. mauritiana* (*a*) и *D. orena* (*б*).

Ch — хромоцентр.

*D. hydei*. Гетерохроматин, напротив, эволюционно лабилен и является наиболее быстро изменяющейся частью генома эукариот, так как состоит главным образом из повторяющихся последовательностей и содержит многочисленные копии мобильных генетических элементов. Различия по количеству гетерохроматина, а также по его распределению в геноме у близкородственных видов встречаются довольно часто (Lohe, Roberts, 2000).

Размер генома у всех видов подгруппы, за исключением *D. oreana*, различается незначительно, гетерохроматин занимает около трети генома этих видов и находится в основном в прицентромерных и теломерных районах; кроме того, небольшие блоки интеркалярного гетерохроматина разбросаны в эухроматине (Schulze et al., 2006). Геном *D. oreana* приблизительно в 1.6 раза больше по размеру, чем у всех остальных видов подгруппы, что обусловлено высоким содержанием гетерохроматина (и, следовательно, сателлитной ДНК), который в ядрах трофоцитов этого вида локализуется в основном в хромоцентре.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что межвидовые различия во взаиморасположении хромосом трофоцитов яичников в некоторой степени отражаются в распределении пробы ДНК. У *D. oreana* она локализуется в хромоцентре, у остальных видов — в основном в прицентромерных районах, и хотя различия по этому параметру между видами существуют (отсутствие сигнала на одном из плеч хромосомы 2 *D. simulans* и локализация сигнала в субтеломерном районе хромосомы 3 *D. erecta*), однако они незначительны. В целом интенсивность сигнала различается на разных хромосомах, что свидетельствует о количественных различиях содержания последовательностей ДНК из хромоцентра *D. oreana* на исследуемых хромосомах. Известно, что от распределения гетерохроматина зависит ориентация хромосом в пространстве ядра. Так *D. oreana* имеет наибольшее количество гетерохроматина, поэтому в ядрах трофоцитов яичников нами была обнаружена хромоцентральная организация хромосом (Вассерлауф, Стегний, 1992).

В отличие от всех остальных видов у *D. oreana* существует территориальность распределения пробы на всех стадиях эндоцикла, в том числе и на стадии  $S_6$ , когда хромосомы полностью декомпактизованы. Таким образом, хромоцентр *D. oreana* не подвергается деконденсации ни на одной из стадий, сохраняясь и на границе фаз  $S_5$  и  $G_5$ , когда происходит распад политенных хромосом, в результате чего ядро переходит на стадию «скрытой» политении с 32 наборами хромосом (Dej, Spradling, 1999).

Консерватизм распределения пробы (преимущественно в прицентромерных районах хромосом) и наличие сильной гомологии последовательностей в геномах всех видов подгруппы свидетельствуют, вероятно, о том, что эволюционные преобразования генома, давшие начало видам данной подгруппы, не привели к кардинальному перераспределению гетерохроматина по геному. Таким образом, несмотря на то, что видоспецифичность морфологии хромосом и особенности их расположения в ядрах генеративной ткани во многом определяются составом и количеством гетерохроматина, по всей видимости, не только эти характеристики гетерохроматина вносят вклад в формирование архитектуры ядра. Вполне возможно, что при дальнейшем детальном исследовании мини-библиотеки ДНК из хромоцентра *D. oreana* будут найдены последовательности ДНК, специфичные для разных видов подгруппы *D. melanogaster*.

Авторы благодарят Н. Б. Рубцова и Т. В. Карамышеву за неоценимую помощь в методической части работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01484), гранта Ведущей научной школы РФ (проект НШ-4283.2006.4) и гранта РНП 2.2.1.1.2038 и при технической поддержке ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (Новосибирск) и Регионального ЦКП Томского государственного университета «Экоген».

### Список литературы

- Вассерлауф И. Э., Стегний В. Н. 1992. Видоспецифичные особенности архитектоники первично политенных хромосом трофоцитов у *Drosophila oreana*, *D. erecta*, *D. teissieri*, *D. yakuba*. Генетика. 26 (3) : 198—201.
- Доубер Г., Браун С., Коэн Э., Даллас Дж., Стрэтчен Т., Трик М. 1986. Динамика эволюции генома и дифференцировка видов. В кн.: Эволюция генома. М.: Мир. 329—356.
- Рубцов Н. Б., Алексеев А. А., Беляева Е. С., Волкова Е. И., Кокоза Е. Б., Макунин И. В., Мошкин Ю. М., Шестопал С. А., Жимулев И. Ф. 1999. Микрочлонирующее и характеристика ДНК из районов прицентромерного гетерохроматина политенных хромосом *Drosophila melanogaster*. Генетика. 35 (1) : 55—61.
- Саленко В. Б. 2007. Полиморфизм эндогенного ретровируса МДГ4 (gypsy) в линиях рода *Drosophila* подгруппы *melanogaster*: Автореф. канд. дис. М. 24 с.
- Стегний В. Н. 1979. Реорганизация структуры интерфазных ядер в онто- и филогенезе малярийных комаров. ДАН СССР. 249 (5) : 1231—1234.
- Стегний В. Н. 1993. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: НГУ. 111 с.
- Стегний В. Н., Вассерлауф И. Э. 1994. Видовая архитектура хромосом генеративной ткани и проблемы филогенетических отношений в подгруппе *melanogaster* рода *Drosophila* (*Sophophora*). Генетика. 30 (4) : 478—483.
- Bonneton F., Wegnez M. 1995. Developmental variability of metallothionein Mtn gene expression in the species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. Develop. Genet. 16 : 253—263.
- Caccone A., Moriyama E. N., Gleason J. M., Nigro L., Powell J. R. 1996. A molecular phylogeny for the *Drosophila melanogaster* subgroup and the problem of polymorphism data. Mol. Biol. Evol. 13 : 1224—1232.
- Dej K. J., Spradling A. C. 1999. The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis. Development. 126 : 293—303.
- Gentile K. L., Burke W. D., Eickbush T. H. 2001. Multiple lineages of R1 retrotransposable elements can coexist in the rRNA loci of *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 18 : 235—240.
- Lachaise D., David J. R., Lemeunier F., Tsacas L., Ashburner M. 1986. The reproductive relationships of *Drosophila sechellia* with *D. mauritiana* and *D. simulans* and *D. melanogaster* from the Afrotropical region. Evolution. 40 : 262—271.
- Lachaise D., Harry M., Solignac M., Lemeunier F., Bensaï V., Cariou M.-L. 2000. Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new *melanogaster* sister species from Sao Tome. Evolution. 267 : 1487—1495.
- Lemeunier F., Ashburner M. 1976. Relationships within the *melanogaster* species subgroup of the genus *Drosophila* (*Sophophora*). II. Phylogenetic relationships between six species based upon polytene chromosome banding sequences. Proc. Royal Soc. London B. 193 : 275—294.
- Lemeunier F., Ashburner M. 1984. Relationships within the *melanogaster* species subgroup of the genus *Drosophila* (*Sophophora*). IV. The chromosome of two new species. Chromosoma. 89 : 343—351.

Lemeunier F., Dutrillax B., Ashburner M. 1978. Relationships within the *melanogaster* subgroup species of the *Drosophila* (*Sophophora*). III. The mitotic chromosomes and quinacrine fluorescent patterns of the polytene chromosome. *Chromosoma*. 69 : 349—361.

Lohe A. R., Roberts P. A. 2000. Evolution of DNA in heterochromatin: the *Drosophila melanogaster* sibling species subgroup as a resource. *Genetica*. 109 : 125—130.

Mal'ceva N. I., Zhimulev I. F. 1993. Extent of polyteny in the pericentric heterochromatin of polytene chromosomes of pseudo-nurse cells of *otu* ovarian tumor mutants of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 240 : 273—276.

Matsuo Y., Inomata N., Yamazaki T. 1999. Evolution of the amylase isozymes in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Biochem. Genet.* 37 : 289—300.

O'Grady P. M., Baker R. H., Durando C. M., Etges W. J., DeSalle R. 2001. Polytene chromosomes as indicators of phylogeny in several species groups of *Drosophila*. *Evol. Biol.* 1—6.

Schulze S. R., McAllister B. F., Sinclair D. A. R., Fitzpatrick K. A., Marchetti M., Pimpinelli S., Honda B. M. 2006. Heterochromatic genes in *Drosophila*: a comparative analysis of two genes. *Genetics*. 173 : 1433—1445.

Takano-Shimizu T. 1999. Local recombination and mutation effects on molecular evolution in *Drosophila*. *Genetics*. 153 : 1285—1296.

Takano-Shimizu T. 2000. Local changes in GC/AT substitution biases and in crossover frequencies on *Drosophila* chromosomes. *Mol. Biol. Evol.* 18 : 678—687.

Поступила 13 III 2008

#### MOLECULAR-CYTOGENETIC ANALYSIS OF PERICENTROMERIC HETEROCHROMATIN IN OVARIAN NURSE CELLS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* SUBGROUP SPECIES

K. E. Usov, T. A. Shelkownikova,<sup>1</sup> I. E. Wasserlauf, V. N. Stegny

Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University;

<sup>1</sup> e-mail: gene@res.tsu.ru

Evolutionary rearrangements of pericentromeric heterochromatin among *Drosophila melanogaster* subgroup species have been investigated. Region-specific DNA library from *Drosophila orena* ovarian nurse cell chromocenter has been obtained by microdissection of polytene chromosomes. The probe was localized on ovarian nurse cells chromosomes of *D. melanogaster* subgroup species using fluorescent *in situ* hybridization. Sequences homologous to the sequences of the DNA-probe were found in chromocenter and pericentromeric regions of *D. orena* polytene chromosomes; and in all pericentromeric regions of other species with several exceptions. So, there was no labeling on one of the arms of *D. simulans* chromosome 2 but such sequences were present on telomere of *D. erecta* chromosome 3 and in regions adjacent to the brightly DAPI-stained heterochromatic blocks of *D. yakuba*, *D. santomea* and *D. teissieri* chromosomes 2 and 3. At S<sub>6</sub> stage (secondary reticulate nucleus), the labeled chromatin in *D. orena* could be found mostly within a restricted area and no such chromatin could be detected throughout the rest of the nucleus. On the contrary, the labeled DNA was spread diffusely in the nuclei of other species at this stage.

**Key words:** *Drosophila melanogaster* species subgroup, ovarian nurse cells polytene chromosomes, pericentromeric heterochromatin, microdissection of chromosomes, FISH-analysis.