

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЦЕНТРОМЕРНЫХ РАЙОНОВ ПОЛИТЕННЫХ ХРОСОМ ХИРОНОМИД (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

В.В. Голыгина^{1,2}, И.И. Кикнадзе¹, А.Д. Брошков^{1,2}, Т.В. Карамышева¹, Н.Б. Рубцов¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия, e-mail: nika@bionet.nsc.ru, kiknadze@bionet.nsc.ru;
kary@bionet.nsc.ru; rubt@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Для изучения молекулярной организации и закономерностей дивергенции последовательностей ДНК в центромерных районах хирономид было создано четыре ДНК-библиотеки центромерного района хромосомы III (EF) 3 видов-близнецов группы *plumosus*: *C. entis*, *C. muratensis* и *C. agilis2*, относящихся к цитокомплексу *thummi*, с комбинацией хромосомных плеч АВ CD EF G. Кроме того, получено 6 ДНК-библиотек из С-положительных дисков политенных хромосом вида *C. dorsalis*, являющегося представителем цитокомплекса *pseudothummi* (комбинация плеч АЕ, CD, BF, G). Проведено сравнение локализации полученных ДНК-проб на хромосомы шести видов группы *plumosus*: *C. agilis*, *C. agilis2*, *C. borokensis*, *C. entis*, *C. muratensis*, *C. plumosus*. Показано, что у большинства изученных видов группы *C. plumosus* все центромерные диски хромосом кариотипа имеют сходный состав, однако у двух видов, *C. entis* и *C. muratensis*, выявлены различия в составе ДНК метацентрических и телоцентрической хромосом. Кроме центромерных районов также обнаружена слабая гибридизация ДНК-пробы с отдельными дисками политенных хромосом. FISH ДНК-проб из центромерного района хромосомы II (CD) и четырех С-положительных дисков хромосом I (AE) и III (BF) *C. dorsalis* с политенными хромосомами показала, что у данного вида на хромосомах I (AE) и III (BF) все четыре крупных С-положительных диска содержат последовательности, гомологичные центромерной ДНК из хромосомы II (CD). Кроме гибридизации в центромерных районах выявлено большое число мест локализации ДНК-пробы в хромосомных плечах. Сравнение полученных результатов с данными по строению центромерных районов другого представителя хирономид, *Prosilocerus akamusi* (Ortocladiina), позволяет заключить, что разные виды из сем. Chironomidae значительно отличаются по молекулярной организации центромерной ДНК.

Ключевые слова: центромера, центромерная ДНК, *Chironomus*, политенные хромосомы, FISH, эволюция, дивергенция.

Введение

Центромеры являются одним из важнейших компонентов генома, играя ключевую роль в процессе расхождения хромосом. Хотя в настоящее время благодаря проведенному секвенированию последовательностей из центромерных районов хромосом нескольких видов животных и растений стали понятны общие принципы организации центромерных районов, детальное строение центромер остается недостаточно изученным. Еще меньше известно о путях дивергенции центромерной

ДНК в ходе эволюции. В то же время сейчас уже совершенно очевидно, что центромерные районы являются одним из самых вариабельных и быстро эволюционирующих компонентов генома, поскольку наблюдаются различия в строении центромерной ДНК не только у разных, в том числе близкородственных, видов, но даже в разных хромосомах одного вида.

Хирономиды представляют собой уникальный объект для изучения закономерностей эволюции центромерной ДНК. В политенных хромосомах хирономид отсутствует недорепликация центромерного гетерохроматина, как

это происходит, например, у дрозофил, поэтому имеется возможность изучать локализацию отдельных центромерных последовательностей с высоким уровнем разрешения и выделять центромерные районы с помощью таких методов, как микродиссекция. Важно, что в этом семействе имеется много групп видов-близнецов, кариотипы которых различаются в основном по размеру центромерного гетерохроматина, а также есть виды, у которых наблюдаются значительные внутри- и межпопуляционные вариации по размеру центромерного гетерохроматина. Многие виды хирономид обладают огромными ареалами, что позволяет изучать закономерности дивергенции генома в популяциях с различной степенью географической изоляции даже на отдельных континентах. Кроме того, значительную роль в эволюции кариотипов видов рода *Chironomus* сыграли реципрокные транслокации целых хромосомных плеч, т. е. хромосомные перестройки, непосредственно затрагивающие центромерные районы и меняющие комбинации групп сцепления генов.

Однако к настоящему времени имеются лишь отдельные данные о строении центромерной ДНК у хирономид (Schmidt *et al.*, 1980; Schmidt, Keyl, 1981; Schmidt, 1984; Hankeln *et al.*, 1989; 1994; Rovira *et al.*, 1993; He *et al.*, 1998; Lopez, Edstrom, 1998; Rosen *et al.*, 2002; Сиирин и др., 2003; Golygina *et al.*, 2008). У нескольких видов из рода *Chironomus* (подсемейство Chironominae) были выделены и отсекарованы мономеры тандемных повторов, характерных для центромерных районов этих видов, изучены их локализация и распространенность у близкородственных видов (Schmidt *et al.*, 1980; Schmidt, Keyl, 1981; Schmidt, 1984; Rovira *et al.*, 1993; Hankeln *et al.*, 1994; He *et al.*, 1998).

Исследования видов-близнецов группы *plumosus* (Hankeln *et al.*, 1994; Сиирин и др., 2003), в которой имеется несколько пар видов, отличающихся в основном по массе центромерного гетерохроматина, показали, что в этой группе увеличение размера центромерного диска происходит в основном за счет амплификации одного типа тандемных повторов – Sau-ДНК, причем этот повтор обнаруживался в центромерных районах всех хромосом кариотипа. Однако данный повтор был выявлен только у 6 из 9 исследованных видов, т. е. у части видов

группы *C. plumosus* произошли значительные изменения в составе повторов центромерной ДНК. Также остается неизвестной степень дивергенции Sau-ДНК у тех видов, у которых она присутствует.

Вместе с тем, мы показали, что в роде *Propillocerus* (подсемейство Orthoclaadiina) состав ДНК центромерных районов различается не только у близких видов, но и в разных хромосомах одного вида (Golygina *et al.*, 2008).

Таким образом, хотя имеются отдельные сведения о структуре центромерной ДНК у хирономид, практически ничего не известно ни о закономерностях ее дивергенции в ходе видообразования, ни о детальном составе ДНК центромерных районов. В настоящей работе мы представляем первые результаты начатого нами исследования закономерностей дивергенции центромерной ДНК в роде *Chironomus* на примере видов из двух наиболее крупных цитоконкомплексов, *thummi* и *pseudothummi*, отличающихся реципрокными транслокациями хромосомных плеч.

Материалы и методы

В работе использованы личинки 4-го личиночного возраста 7 видов рода *Chironomus*, собранные в палеарктических природных популяциях: *C. borokensis* (Россия, Новосибирская область, пруд в р-не г. Бердска; Кемеровская область, пруд на р. Новоказанка), *C. agilis* (Россия, Новосибирская область, пруд на р. Тарсьма), *C. sp. prope agilis (C. agilis2)* (Казахстан, оз. Тундык), *C. entis* (Россия, водоем в Новосибирской области), *C. muratensis* (Россия, Новосибирская область, пруд на р. Сокур), *C. plumosus* (Россия, Новосибирская область), *C. dorsalis* (Россия, г. Новосибирск, окрестности новосибирского Академгородка). У *C. entis* была изучена также неарктическая популяция (США, Миннесота, оз. Кабетогамма).

Личинок фиксировали по стандартной методике (Кикнадзе и др., 1991) в смеси 96°-го этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Давленные препараты политенных хромосом слюнных желез для кариологического анализа готовили по стандартной ацет-орсеиновой методике (Keyl H.G., Keyl I., 1959; Кикнадзе и др., 1991). Давленные

препараты политенных хромосом для проведения микродиссекции и флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) готовили по методике, описанной в работе Сиирин и соавт. (2003).

Получение микродиссекционных библиотек и приготовление ДНК-проб. Микродиссекцию выбранных для исследования районов и создание ДНК-проб проводили так же, как описано в работе Сиирин и соавт. (2003).

На первом этапе работы была проведена микродиссекция центромерных дисков у трех видов рода *Chironomus* из цитокомплекса *thummi* (комбинация плеч АВ CD EF G) и одного вида из цитокомплекса *pseudothummi* (комбинация плеч АЕ CD BF G). С помощью проведенного на выделенном материале DOP-ПЦР получены 4 ДНК-библиотеки из центромерного района хромосомы III (EF) для 3 видов-близнецов группы *plumosus* (цитокомплекс *thummi*): по одной для *C. agilis2* и *C. muratensis* и 2 для *C. entis* (из неарктической и палеарктической популяций); 6 микродиссекционных ДНК-библиотек для вида *C. dorsalis* (цитокомплекс *pseudothummi*): 2 из центромерного района хромосомы II (CD) и по одной из 4 С-положительных дисков хромосом I (AE) и III (BF) (рис. 1, табл. 1). Также была использована полученная ранее ДНК-библиотека из центромерного района хромосомы III (EF) вида *C. borokensis*, входящего в группу *plumosus* (Сиирин и др., 2003).

Для получения ДНК-проб использовали модифицированные нуклеотиды биотин-11-dUTP или дигоксигенин-11-dUTP.

Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). Флюоресцентная *in situ* гибридизация проводилась согласно стандартному протоколу, описанному в работе М.Т. Сиирин и соавт. (2003). Визуализация ДНК-проб, модифицированных биотином и дигоксигенином, проводилась с помощью антител, меченных флюорохромами AlexaFluor488 и Cy3 соответственно. Хромосомы были окрашены красителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид). Анализ препаратов проводили на эпифлюоресцентном микроскопе Axioskop 2 plus (Карл Цейс, Германия), оснащенном CCD камерой, набором фильтров CHROMA и пакетом программ для обработки изображений ISIS4 (MetaSystems-Group, Inc., USA).

Результаты и обсуждение

Локализация ДНК-проб из центромерного района хромосомы III у видов группы *C. plumosus*. Гибридизация всех пяти ДНК-проб была проведена как на хромосомы видов, из которых были получены ДНК-пробы (гомологичная гибридизация), так и на хромосомы других видов группы, изучаемых в данной работе (гетерологичная гибридизация): *C. agilis*, *C. agilis2*, *C. borokensis*, *C. entis* (из палеарктических и неарктических популяций), *C. muratensis* и *C. plumosus*.

Гомологичная гибридизация ДНК-проб. У вида *C. borokensis* при гибридизации ДНК-пробы *sbcen* (табл. 1) яркий сигнал наблюдался в центромерных районах всех четырех хромосом кариотипа. Очень слабая гибридизация также наблюдалась в нескольких дисках на разных хромосомах (рис. 2, а).

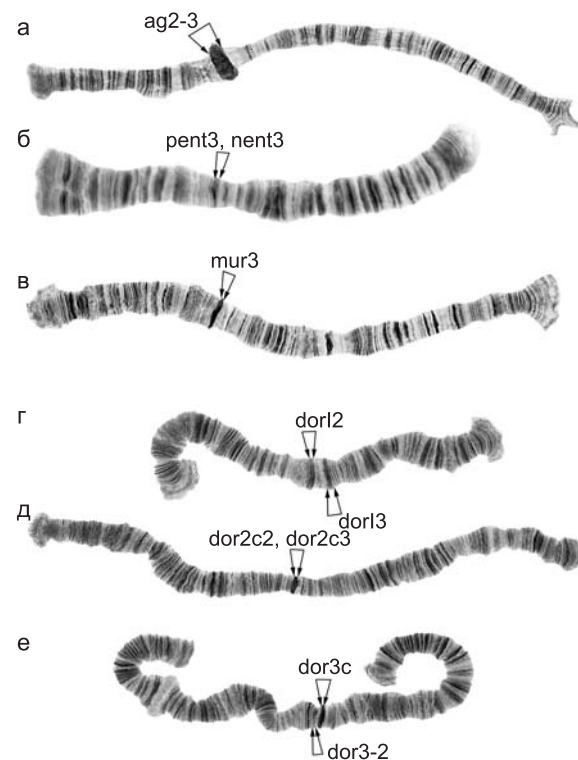


Рис. 1. Районы микродиссекции.

а – хромосома III (EF) вида *C. agilis2*; б – хромосома III (EF) вида *C. entis*; в – хромосома III (EF) вида *C. muratensis*; г – хромосома I (AE) вида *C. dorsalis*; д – хромосома II (CD) вида *C. dorsalis*; е – хромосома III (BF) вида *C. dorsalis*. Скобками указаны границы диссецированных районов.

Таблица 1

Список использованных в исследовании микродиссекционных ДНК-библиотек

Обозначение библиотеки	Вид	Хромосома	Сайт микродиссекции	Получена
cbcen	<i>C. borokensis</i>	III (EF)	центромера	Сиирин и соавторы, 2003
ag2-3	<i>C. sp. prope agilis</i> (<i>C. agilis2</i>)	III (EF)	центромера	наст. работа
pent3	<i>C. entis</i> (Палеарктика)	III (EF)	центромера	наст. работа
nent3	<i>C. entis</i> (Неарктика)	III (EF)	центромера	наст. работа
mur3	<i>C. muratensis</i>	III (EF)	центромера	наст. работа
dor12	<i>C. dorsalis</i>	I (AE)	крупный С-положительный диск 19ef, прилегающий к плечу А	наст. работа
dor13	<i>C. dorsalis</i>	I (AE)	крупный С-положительный диск, предположительно центромерный, прилегающий к плечу Е	наст. работа
dor2c2	<i>C. dorsalis</i>	II (CD)	центромера	наст. работа
dor2c3	<i>C. dorsalis</i>	II (CD)	центромера	наст. работа
dor3c	<i>C. dorsalis</i>	III (BF)	крупный С-положительный диск, прилегающий к плечу F	наст. работа
dor3-2	<i>C. dorsalis</i>	III (BF)	тонкий С-положительный диск, находящийся между крупными С-положительными дисками	наст. работа

У вида *C. agilis2* ДНК-проба ag2-3 (табл. 1) также гибридизовалась преимущественно в центромерных районах всех четырех хромосом.

Картина гибридизации зонда mur3 (табл. 1) на хромосомы *C. muratensis* оказалась иной: четкий сигнал обнаружен только в центромерных районах трех больших хромосом кариотипа, тогда как центромерный район хромосомы IV (G) практически не метился.

У *C. entis* характер гибридизации ДНК-проб, полученных из палеарктических и неарктических популяций, оказался различен. ДНК-проба pent3 (табл. 1), полученная из неарктической популяции *C. entis*, при гибридизации на хромосомы *C. entis* из неарктической популяции давала яркий сигнал на всех центромерных районах хромосом кариотипа. В то же время ДНК-проба pent3, полученная из палеарктической популяции *C. entis*, при гибридизации на хромосомы *C. entis* из палеарктической популяции давала четкий сигнал только в центромерных районах трех больших хромосом, в то время как в цен-

тромерном районе короткой хромосомы IV (G) гибридизация была очень слабой или отсутствовала вовсе (рис. 2, б).

Таким образом, по характеру гибридизации ДНК-проб на кариотипы исходных видов их можно разбить на 2 группы: в первую попадают *C. borokensis*, *C. agilis2* и неарктический *C. entis*, у которых центромерные районы всех хромосом метятся одинаково ярко ДНК-пробой из хромосомы III (EF), что свидетельствует о высокой гомологии последовательностей во всех центромерных районах у каждого из этих видов; во 2-й группе оказываются палеарктический *C. entis* и *C. muratensis*, у которых гомологичные последовательности обнаруживаются только в центромерных районах трех больших хромосом, а центромерный район хромосомы IV, по-видимому, содержит преимущественно другие последовательности ДНК. Следует также особо отметить тот факт, что в палеарктических и неарктических популяциях *C. entis* обнаружены разные типы гибридизации,

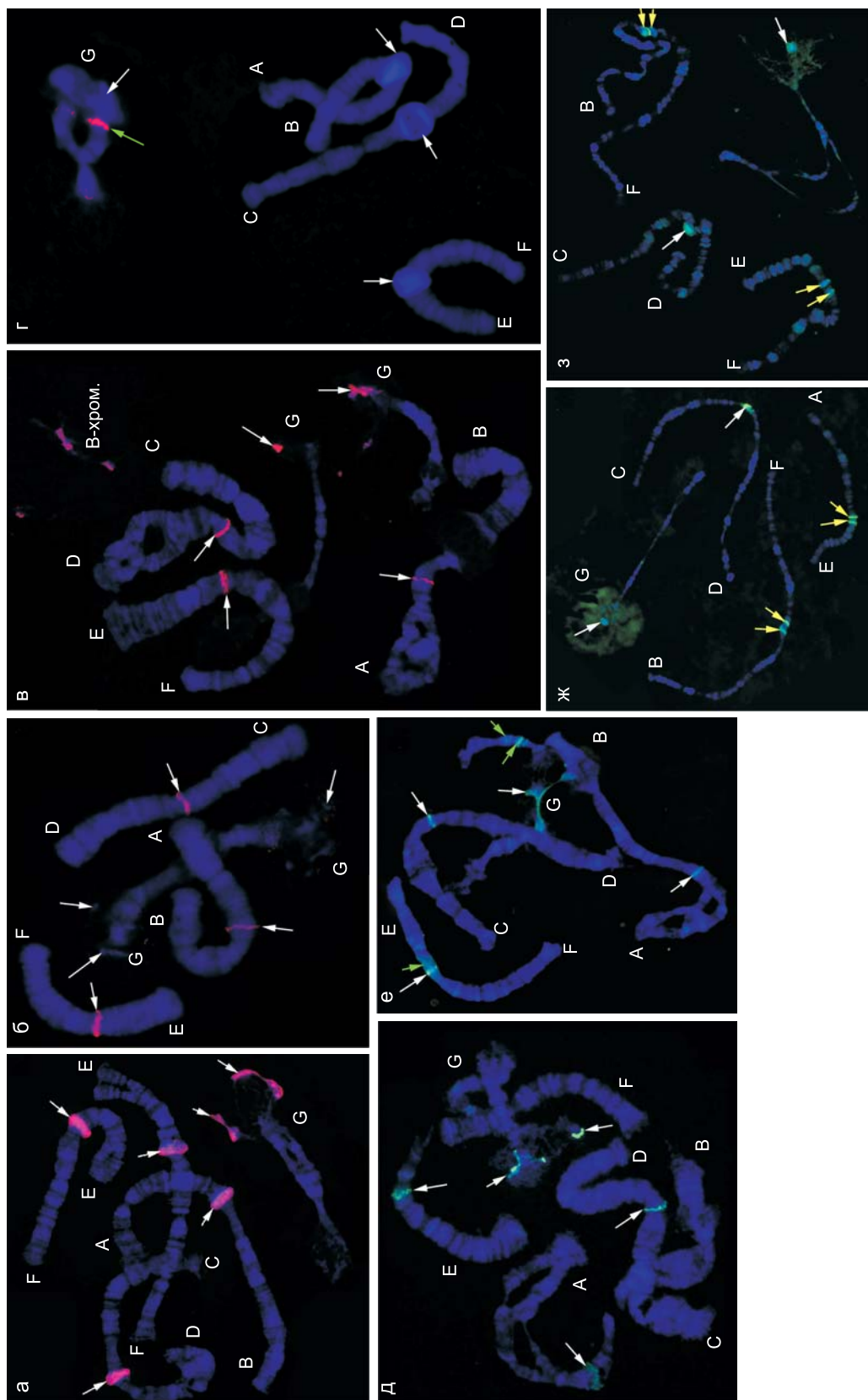


Рис. 2. FISH ДНК-проб на политенные хромосомы изучаемых видов.

а – ДНК-проба *свепс*, кариотип *C. borokensis*; б – ДНК-проба *реп3*, кариотип *C. entis* из палеарктической популяции; в – ДНК-проба *свепс*, кариотип *C. plimosis*; г – ДНК-проба *реп3*, кариотип *C. agilis2*; д – ДНК-проба *реп3*, кариотип *C. entis* из палеарктической популяции; е – ДНК-проба *аg2-3*, кариотип *C. plimosis*; ж – ДНК-проба *дог2с2*, кариотип *C. dorsalis*; з – ДНК-проба *дог3-2*, кариотип *C. dorsalis*. Белыми стрелками обозначены центромерные районы, желтыми стрелками обозначены С-положительные диски в хромосомах I (AE) и III (CD) *C. dorsalis*; зелеными стрелками обозначены места локализации проб в дисках на хромосомных плечах. Буквами обозначены плечи хромосом.

поскольку это свидетельствует о значительном уровне дивергенции популяций этого вида с разных континентов, что хорошо согласуется с полученными ранее цитогенетическими данными (Kiknadze *et al.*, 2000).

Гетерологичная гибридизация ДНК-проб (на хромосомы близкородственных видов). ДНК-проба *cbsep* гибридизовалась со всеми центромерными районами хромосом *C. plumosus* с примерно одинаковой интенсивностью, кроме того, на препарате с В-хромосомами сигнал также был обнаружен в более плотных районах В-хромосом (рис. 2, в). При гибридизации с хромосомами *C. entis* из палеарктических популяций яркий сигнал наблюдался только в центромерном районе хромосомы IV (G), а в центромерных районах трех больших хромосом интенсивность гибридизации была слабой. В то же время в неарктической популяции *C. entis* сигнал практически отсутствовал во всех хромосомах. У *C. muratensis* ДНК-проба *cbsep* гибридизовалась только с центромерным районом хромосомы IV (G). Также слабый сигнал наблюдался в центромерном и прилегающих к нему дисках хромосомы III (EF). У видов *C. agilis* и *C. agilis2* сигналов выявлено не было.

ДНК-проба *ag2-3* давала яркий сигнал в центромерных районах всех четырех хромосом *C. agilis* и очень слабый сигнал в центромерных районах *C. borokensis* и *C. plumosus*, причем у последнего гибридизация в хромосоме IV (G) была несколько ярче, чем в остальных хромосомах. Гибридизации с хромосомами видов *C. entis* и *C. muratensis* выявлено не было.

При гибридизации ДНК-пробы *pent3* с хромосомами изученных видов относительно яркий сигнал наблюдался только в центромерных районах больших хромосом *C. entis* из неарктических популяций. Кроме того, очень яркий сигнал был обнаружен в одном из дисков хромосомы IV (G) *C. agilis2*, в то время как в центромерных районах этого вида гибридизация практически отсутствовала (рис. 2, г).

ДНК-проба *pent3* гибридизовалась с центромерными районами всех четырех хромосом *C. entis* из палеарктической популяции, однако интенсивность гибридизации в хромосоме IV была значительно выше (рис. 2, д). Слабая гибридизация в центромерном и прилегающем к нему дисках обнаружена в хромосоме III (EF)

у видов *C. borokensis*, *C. agilis*, *C. muratensis*, *C. plumosus*. Кроме того, у *C. plumosus* относительно яркий сигнал также наблюдался в центромерном районе хромосомы IV (G).

При гибридизации ДНК-пробы *mur3* относительно интенсивная гибридизация была обнаружена только в центромерных районах трех больших хромосом *C. entis* из палеарктических популяций. Кроме того, слабая гибридизация наблюдалась с центромерными районами всех хромосом *C. plumosus* и *C. entis* из неарктической популяции. На хромосомах *C. agilis*, *C. agilis2* и *C. borokensis* сигналов обнаружено не было.

Таким образом, из полученных данных можно заключить, что среди изученных видов-близнецов группы *C. plumosus* наибольшая степень гомологии между последовательностями ДНК центромерных районов наблюдается в парах видов *C. borokensis*–*C. plumosus* и *C. agilis*–*C. agilis2*, у которых результаты гибридизации ДНК-проб *cbsep* и *ag2-3* соответственно совпадают при гомо- и гетерологичной гибридизации. У этих четырех видов также наблюдается наибольшее сходство между центромерными районами всех хромосом кариотипа. Все это хорошо согласуется с полученными ранее данными (Hankeln *et al.*, 1994).

Большая степень дивергенции центромерных районов наблюдается между палеарктическими и неарктическими популяциями вида *C. entis*, а также между *C. entis* и *C. muratensis*, поскольку интенсивность сигналов при гетерологичной гибридизации была значительно ниже, чем в экспериментах с гомологичной гибридизацией ДНК-проб, причем не все центромерные районы метились с одинаковой интенсивностью. Более значительные различия в составе ДНК центромерных районов обнаружены между *C. entis* и видами *C. plumosus* и *C. borokensis*, так как при гетерологичной гибридизации ДНК-проб заметный сигнал наблюдался, в основном, только в центромерных районах хромосомы IV (G). Еще более глубокая дивергенция в составе центромерной ДНК, по-видимому, произошла между видами *C. agilis* и *C. agilis2*, с одной стороны, и *C. plumosus* и *C. borokensis*, с другой, так как интенсивность гетерологичной гибридизации ДНК-проб у этих пар видов очень незначительна в центромерных районах всех

хромосом. Наконец, гомология между центромерными районами видов *C. agilis* и *C. agilis2*, с одной стороны, и *C. muratensis* и *C. entis* (как палеарктического, так и неарктического), с другой, по-видимому, практически отсутствует. Полученные данные хорошо согласуются с относительным положением изученных видов на филогенетическом дереве (Golygina *et al.*, 2007), где пары видов *C. borokensis*–*C. plumosus* и *C. agilis*–*C. agilis2* являются наиболее близкими, а *C. entis* и *C. muratensis* наиболее удалены от *C. agilis* и *C. agilis2*.

В то же время следует отметить, что Sau-ДНК, выделенная из генома *C. plumosus* (Hankeln *et al.*, 1994), интенсивно гибридизовалась не только с центромерными районами *C. plumosus* и *C. borokensis*, но также и с центромерными районами *C. entis*, *C. agilis* и *C. agilis2*, тогда как в наших экспериментах ДНК-пробы, полученные из ДНК-библиотек *C. agilis2*, *C. borokensis* и *C. entis*, показывают намного более низкую степень межвидовой гомологии. Поскольку Sau-ДНК представлена только одним тандемным повтором, в то время как микродиссекционные ДНК-библиотеки, как правило, содержат большое количество различных последовательностей ДНК, можно предположить, что хотя у видов *C. entis*, *C. agilis* и *C. agilis2* в центромерных районах присутствуют последовательности ДНК, гомологичные Sau-ДНК, в целом состав центромерной ДНК значительно отличается от такового у *C. plumosus* и *C. borokensis*.

Также нужно отметить, что в большинстве экспериментов по межвидовой гибридизации сигнал в хромосоме III (EF) наблюдался не только в самом центромерном районе, но также и в нескольких расположенных рядом дисках по обе стороны от центромерного (рис. 2, е), при этом в остальных хромосомах в прицентромерной области сигналов обнаружено не было. В экспериментах по гомологичной гибридизации ДНК-проб подобной особенности локализации зондов в хромосоме III также не обнаружено – гибридизация наблюдалась только в центромерном диске. В то же время практически во всех проведенных экспериментах наблюдалось лишь незначительное количество слабых сигналов в остальных районах хромосом, т. е. все полученные ДНК-библиотеки обладают высокой специфичностью к центромерным районам.

Локализация ДНК-проб из центромерного района хромосомы II (CD) и С-положительных дисков из хромосом I (AE) и III (BF) у вида *C. dorsalis*. Кариотип *C. dorsalis* характеризуется очень необычной для рода *Chironomus* морфологией хромосом: в хромосомах I (AE) и III (BF) в районах, где должны быть расположены центромеры, вместо одного С-положительного диска (центромерного), как у всех остальных исследованных видов рода, выявляется по 2 крупных С-положительных диска, между которыми расположены еще по 2–3 тонких С-положительных диска (Kiknadze *et al.*, 2008). Таким образом, ни цитологическое картирование, ни С-окрашивание не дают ответа на вопрос, какой из дисков является истинно центромерным. Этот вопрос тем более интересен, что эти две хромосомы отличаются в цитоконкомплексах *thummi* и *pseudothummi* реципрокными транслокациями хромосомных плеч (AB и EF у видов цитоконкомплекса *thummi*, AE и BF у видов цитоконкомплекса *pseudothummi*), т. е. возможно, что в случае с *C. dorsalis* имеет место возникновение нецентромер.

Для изучения данного вопроса с помощью микродиссекции были вырезаны ДНК-библиотеки из центромерного района хромосомы II (CD), в которой локализация центромеры не вызывает сомнений (один С-положительный диск, порядок дисков в районе центромеры в точности совпадает с порядком дисков в этом районе у остальных видов рода), и С-положительные диски из хромосом I (AE) и III (BF): два больших диска из хромосомы I (диск, являющийся центромерным, согласно цитогенетическому картированию, и диск 19ef), один большой (прилегающий к плечу F диск, являющийся центромерным, согласно цитогенетическому картированию) и один тонкий С-положительный диск из хромосомы III (BF) (рис. 1, г–е, табл. 1).

Все полученные ДНК-пробы были гибридизованы на хромосомы *C. dorsalis*. Оказалось, что ДНК-пробы *dog2c2* и *dog2c3* из центромерного района хромосомы II (CD) наиболее интенсивно гибридизуются с центромерными районами хромосом II (CD) и VI (G), двумя крупными С-положительными дисками хромосом I (AE) и двумя крупными С-положительными дисками хромосомы III (BF). Кроме того, имеется много сайтов локализации данных проб в отдельных

дисках на хромосомных плечах, хотя интенсивность гибридизации в этих сайтах ниже, чем в центромерных и С-положительных дисках (рис. 2, ж).

ДНК-проба *dor13* из С-положительного диска хромосомы I – центромерного, согласно цитогенетическому картированию, – также давала похожую картину гибридизации. В то же время ДНК-проба *dor12* из второго крупного С-положительного диска хромосомы I (район 19ef) наиболее интенсивно гибридизовалась только на сайт, из которого была получена, а интенсивность гибридизации в остальных С-положительных и центромерных дисках была ниже и сравнима с уровнем гибридизации в других дисках в плечах хромосом. Сходная картина наблюдалась при гибридизации пробы *dor3c*.

Проба *dor3-2*, полученная из тонкого С-положительного диска хромосомы III, расположенного между двумя крупными С-положительными дисками, давала наиболее интенсивный сигнал в этом же диске; также довольно интенсивная гибридизация обнаружена в центромерных и крупных С-положительных дисках всех хромосом, но не в тонких С-положительных дисках хромосомы I (AE) (рис. 2, з). Кроме того, относительно слабые сигналы обнаружены во многих дисках на хромосомных плечах.

Также была проведена гибридизация ДНК-пробы *dor2c3* с хромосомами *C. riparius* (цитоккомплекс *thummi*) и *C. melanescens* (цитоккомплекс *pseudothummi*), однако на хромосомах этих видов сигналов не выявлено.

Таким образом, можно заключить, что в составе всех четырех крупных С-положительных дисков на хромосомах I (AE) и III (BF) *C. dorsalis* имеются последовательности, гомологичные тем, что присутствуют в центромерном диске хромосомы II (CD), т. е. помимо центромерных дисков последовательности ДНК, характерные для центромерного района хромосомы II (CD), присутствуют также в дисках 19ef плеча А и 28de плеча В. Следует также отметить тот факт, что все ДНК-пробы *C. dorsalis* имели много сайтов локализации вне центромерных или С-положительных районов, что, по-видимому, свидетельствует о наличии значительного числа повторов в геноме *C. dorsalis*, как это наблюдается, например, у *C. riparius*, у которого сайты локализации центромерного повтора *Cl*

обнаружены не только в центромерных дисках, но и во многих других дисках на хромосомных плечах (Schmidt, 1984).

Обобщая полученные результаты, можно отметить, что изученные нами виды из двух цитоккомплексов рода *Chironomus* имеют как общие, так и отличительные черты в характере гибридизации ДНК-проб из центромерных районов. Характерной особенностью всех изученных видов является то, что последовательности ДНК, представленные в центромерном районе одной хромосомы, также присутствуют в центромерных районах остальных хромосом, хотя степень их представленности в других хромосомах может быть различной. В то же время виды могут различаться по степени распространенности последовательности ДНК из центромерных районов в остальной части генома. Однако к настоящему времени изучено слишком мало видов, чтобы можно было оценить, имеются ли отличия по этому признаку между видами из разных цитоккомплексов.

Сравнение распределения последовательностей центромерной ДНК по хромосомам у видов рода *Chironomus*, принадлежащих к подроду *Chironomus*, в который входят все виды, изученные в данной работе, и видов подрода *Camptochironomus* из этого же рода, для которых имеются подобные сведения, показало, что строение центромерных районов у них сходно (Rovira *et al.*, 1993; Lopez, Edstrom, 1998). В то же время в роде *Prosilocerus*, который относится к подсемейству Orthoclaadiinae, степень дивергенции центромерных районов как между видами, так и между хромосомами одного вида значительно выше, поскольку у изученного вида *P. akamusi* ДНК-пробы из центромерного района одной хромосомы показывали лишь слабую гомологию с центромерными районами других хромосом, а гибридизация с хромосомами вида-близнеца, *P. jacuticus*, цитогенетическая дивергенция которого от *P. akamusi* не превышает ту, что наблюдается между видами группы *C. plumosus*, вовсе отсутствовала (Golygina *et al.*, 2007). Таким образом, можно заключить, что организация и степень дивергенции центромерной ДНК в разных таксонах семейства Chironomidae может значительно отличаться, причем эти отличия увеличиваются по мере увеличения ранга сравниваемых таксонов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-04-01440ф, программы РАН «Генофонды и генетическое разнообразие природных и экспериментальных популяций» и госконтракта № 60/2010.

Литература

- Кикнадзе И.И., Шилова А.И., Керкис И.Е. и др. Кариотипы и морфология личинок трибы Chironomini. Атлас. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 114 с.
- Сиирин М.Т., Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика В-хромосом у хирономид (Diptera, Chironomidae) // Цитология. 2003. Т. 45. № 6. С. 582–589.
- Golygina V.V., Kiknadze I.I., Istomina A.G. *et al.* Cytogenetic divergence of genomes in *Chironomus plumosus* group (Diptera: Chironomidae) // Comp. Cytogen. 2007. V. 1. № 1. P. 17–32.
- Golygina V.V., Rubzov N.B., Karamisheva T.V., Kiknadze I.I. Divergence of centromeric heterochromatin is an important way of evolution in the genus *Propilosocerus* (Diptera, Chironomidae) // Contemporary Aquatic Entomological Study in East Asia: Proc. of the 3rd Intern. Symp. on Aquatic Entomology in East Asia / Ed. X. Wang. Tianjin, China: Nankai University Press, 2008. P. 21–31.
- Hankeln T., Keyl H.-G., Schmidt E.R. DNA-probes for the investigation of chromosome evolution in *Chironomus*. II. Repetitive sequences // Acta Zool. Acad. Sci. Hungaricae. 1989. V. 2. P. 219–227.
- Hankeln T., Filippova M.A., Kiknadze I.I. *et al.* Centromeric heterochromatin and satellite DNA in the *Chironomus plumosus* group // Genome. 1994. V. 37. № 6. P. 925–934.
- He H., Liao C., Edstrom J.E. Centromere 3 specific tandem repeat from *Chironomus pallidivittatus* // Chromosoma. 1998. V. 107. № 5. P. 304–310.
- Keyl H.G., Keyl I. Die Cytologische Diagnostik der Chironomiden. I. Bestimmungstabelle für die Gattung *Chironomus* auf Grund der Speicheldrüsenchromosomen // Arch. Hydrobiol. 1959. Bd. 59. S. 43–57.
- Kiknadze I.I., Butler M.G., Golygina V.V. *et al.* Intercontinental karyotypic differentiation of *Chironomus entis* Shobanov, a Holarctic member of the *C. plumosus* group (Diptera, Chironomidae) // Genome. 2000. V. 43. № 5. P. 857–873.
- Kiknadze I.I., Golygina V.V., Broshkov A.D. *et al.* Mystery of *Chironomus dorsalis* Meigen karyotype (Diptera, Chironomidae) // Comp. Cytogen. 2008. V. 2. № 1. P. 21–35.
- Lopez C.C., Edstrom J.E. Interspersed centromeric element with a CENP-B box-like motif in *Chironomus pallidivittatus* // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. № 18. P. 4168–4172.
- Rosen M., Castillejo-Lopez C., Edström J.E. Telomere terminating with centromere-specific repeats is closely associated with a transposon derived gene in *Chironomus pallidivittatus* // Chromosoma. 2002. V. 110. № 8. P. 532–541.
- Rovira C., Beermann W., Edström J.E. A repetitive DNA sequence associated with the centromeres of *Chironomus pallidivittatus* // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 8. P. 1775–1781.
- Schmidt E.R. Clustered and interspersed repetitive DNA family in *Chironomus* // J. Mol. Biol. 1984. V. 178. P. 1–15.
- Schmidt E.R., Keyl H.G. *In situ* binding of AT-rich repetitive DNA to the centromeric heterochromatin in polytene chromosomes of chironomids // Chromosoma. 1981. V. 82. № 2. P. 197–204.
- Schmidt E.R., Vistorin G., Keyl H.-G. An AT-rich DNA component in the genomes of *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger* // Chromosoma. 1980. V. 76. P. 35–45.

STRUCTURAL FEATURES OF CENTROMERES IN POLETENE CHROMOSOMES OF CHIRONOMIDAE (DIPTERA) SPECIES

V.V. Golygina^{1,2}, I.I. Kiknadze¹, A.D. Broshkov^{1,2}, T.V. Karamysheva¹, N.B. Rubtsov¹

¹Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: nika@bionet.nsc.ru; kiknadze@bionet.nsc.ru; kary@bionet.nsc.ru; rubt@bionet.nsc.ru;

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The goal of this study was to investigate the molecular organization and divergence features of DNA sequences in centromeric regions of Chironomidae. For this purpose, four DNA libraries of chromosome III centromeres were created for three sibling species of the *plumosus* group: *C. entis*, *C. muratensis*, and *C. agilis*², belonging to the cytochrome complex thummi with arm combinations AB, CD, EF, G. In addition, six DNA libraries were obtained from centromeric and C-positive bands of polytene chromosomes of *C. dorsalis*, which belongs to the pseudothummi cytochrome complex and has a centromere structure unusual for the genus *Chironomus*. All DNA libraries were localized on polytene chromosomes of the corresponding species. It was found that all centromere disks in most species of the *plumosus* group considered in this study had similar compositions, but two species displayed differences in DNA composition in the metacentric and telocentric chromosomes. In addition to the centromeric regions, weak hybridization of DNA probes was recorded in some disks on chromosome arms. Fluorescence *in situ* hybridization of DNA probes from the centromeric region of chromosome II (CD) and C-positive bands of chromosomes I (AE) and III (BF) of *C. dorsalis* to polytene chromosomes showed that all of the four major C-positive bands of this species on chromosomes I (AE) and III (EF) contained sites homologous to the centromeric DNA of chromosome II (CD), and many hybridization sites were observed outside the centromeres. Comparison of our results with data on the centromere structure of another Chironomidae species, *Prosilocerus akamusi* (Ortocladiina), indicates that Chironomidae species broadly vary in the molecular organization of centromeric DNA.

Key words: centromere, centromeric DNA, *Chironomus*, polytene chromosomes, FISH, evolution, divergence.