

12. Самовол О.П. Генетичний потенціал видів родів *Capsicum* L. и *Lycopersicon* T. та шляхи розширення спектру генотипової мінливості: автореф. дис... д.с.-г.н. – К., 2004. – 35 с.
13. Самовол О.П., Зінченко Т.О., Виродова О.П., Данаїлов Ж., Кранчев Б. Нові підходи до оцінки гетерозисного ефекту у помідорів за продуктивністю // Овочівництво і баштанництво. – Вип. 40. – 1995. – С. 42 – 46.
14. Самовол А.П., Тярина В.С., Гарбуз Л.И. Влияние конкурентоспособности гибридов F₁ на воспроизводящую и преобразующую функцию мейоза // Тез. докл. конф. «Экологическая генетика животных и растений». – Кишинев: Штиинца, 1987. – С. 45-46.
15. Самовол А.П., Юрченко А.П., Монтвид П.Ю. Эффект вертикальной зависимости в проявлении характера высвобождения спектра генотипической изменчивости // Тез. докл. Международн. конф. «Селекция и семеноводство в XXI веке». – Москва, 2000. - С. 175 -176.
16. Смирнов В.Г. Цитогенетика. – М.: Наука, 1991. – 247 с.
17. Тоцький В.М. Генетика. – Одеса: Астропринт, 2002. – 712 с.
18. Mumford L., Paule M. Competitive advantage of normal leaf morphotype in a population of *Pisum sativum* L. // Flora. – 1985. – Vol. 177, № 3-4. – P. 133 – 138.
19. Sriwastava H.K. Heterosis for chiasma frequency and quantitative traits in Common beans // Theor. Appl. Genetics. – 1980. – Vol. 56. – P. 25-29.
20. Tuscan G.A. Inherent differences in family response to inter – family competition in loblolly pine // Silvae genet. – 1986. - Vol. 35, № 2 – 3. – P. 112 – 118.

Резюме

Проведены исследования цитологических параметров мейоза у гибридов F₁ арбуза с разной онтогенетической приспособленностью. У растений низкоприспособленных гетерозигот выявлено повышение частоты хиазм, нетипичных бивалентов, мостов в анафазе I в экстремальных условиях. Сделан вывод о снижении точности кроссинговера у гибридов с низкой онтогенетической приспособленностью.

Проведено дослідження цитологічних параметрів мейозу у гібридів F₁ кавуна з різною онтогенетичною пристосованістю. У рослин низькоприспособлених гетерозигот виявлено зростання частоти хіазм, нетипових бівалентів, мостів в анафазі I в екстремальних умовах. Зроблено висновок про зниження точності кросинговеру та інтерференції обмінів у гібридів з низькою онтогенетичною пристосованістю.

There are conducted investigations of meiosis cytological in watermelon F₁ hybrids with different ontogenetical fitness. In plants of low-fitted heterozygotes there are revealed the frequency of chiasma, untypical bivalents, bridges in the anaphase I under extreme conditions. The conclusion is drawn about reduction of exchanges of crossing-over in hybrids with low ontogenetical fitness.

МУРАВЕНКО О.В.

*Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН,
Москва 119991 ул.Вавилова 32, тел.1359792, e-mail: chrom@eimb.ru*

ПОВЫШЕНИЕ РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ АНАЛИЗА КАРИОТИПОВ МЕЛКОХРОМОСОМНЫХ РАСТЕНИЙ

Эволюция видов неразрывно связана с изменчивостью генома, поэтому изучение молекулярной и хромосомной организации геномов позволяет понять ее закономерности [1]. Первой ступенью в изучении геномов является точная идентификация хромосом – дискретных частей единого генетического целого. Для растений, геном которых богат повторяющимися последовательностями ДНК, а размеры хромосом в кариотипе более 5 мкм, анализ хромосом по рисункам С-дифференциального окрашивания, обычно, не

представляет проблем. Растения с мелкими хромосомами, как правило, имеют и небольшие размеры геномов, которые содержат значительно меньше повторяющихся последовательностей ДНК различных классов [2]. Морфологически особенности молекулярно-структурной организации небольших геномов выражаются в бедности рисунка С-дифференциального окрашивания по длине хромосомы [3], что, в свою очередь, ведет к невозможности распознавания таких хромосом. Проблема идентификации становится особенно актуальной для хозяйственно-ценных растений. Соотнесение генетических групп сцепления с цитологическим образом конкретной хромосомы генома соединяет в единое целое молекулярные, генетические и цитогенетические данные. Это открывает широкие возможности для проведения сравнительного картирования хромосом, анализа хромосомных перестроек, получения и изучения гибридов, исследования эволюции геномов культурных растений и их дикорастущих сородичей, а также переводит процесс получения новых устойчивых высокопродуктивных сортов на качественно новый уровень. В данной работе представлен эффективный подход к исследованию кариотипов растений с небольшими хромосомами.

Материалы и методы

Подход включает комплекс высокоразрешающих молекулярно-цитогенетических методов позволяющих получать на мелких хромосомах достаточное для распознавания число маркеров и проводить сравнительные исследования кариотипов. Варианты методик приготовления и окрашивания хромосом были разработаны нами под решение конкретных исследовательских задач при изучении кариотипов хлопчатников, ромашек, льнов и опубликованы ранее [4-9]. Использование компьютерных систем получения изображения хромосом и программ его обработки, а также специализированных программ хромосомного анализа дают возможность идентификации и сравнительного исследования хромосом самых малых размеров.

Результаты и обсуждение

Разработка подхода к анализу хромосом малых размеров велась в нескольких направлениях: увеличение длины хромосом, повышение разрешения дифференциального окрашивания, использование в качестве маркеров хромосомной локализации повторяющихся последовательностей ДНК.

При малых размерах метафазных хромосом для исследования используют прометафазные хромосомы или метафазные хромосомы, не достигшие своей максимальной степени конденсации, на которых разрешающая способность дифференциального окрашивания повышается либо можно использовать сами рисунки дифференциальной конденсации хромосом для их идентификации [10]. К числу агентов задерживающих конденсацию хромосом относятся интеркаляторы ДНК.

Нами разработана эффективная методика получения препаратов в большом числе прометафазных хромосом с помощью интеркалятора 9-аминоакридина [4]. Использование этой методики позволяет повышать разрешение рисунка С-окраски хромосом небольших размеров. Проведено исследование достоверности оценки размеров и положения С-бэндов на таких хромосомах. Показана применимость препаратов мелких хромосом растений удлинённых действием интеркалятора ДНК как для качественного (наличие-отсутствие района) так и для количественного (размер района) цитогенетического анализа. Установлено, что при исследовании С-окраски хромосом малых размеров наиболее оптимальной для анализа является длина хромосомы, превышающая размер максимально сконденсированной метафазной хромосомы в 2-3 раза. [5]. С использованием такого подхода идентифицированы хромосомы по рисунку С-окраски в кариотипах ромашки, гороха и льна [8,11].

С использованием 9-аминоакридина разработана модифицированная методика получения высокоразрешающего ОР-дифференциального окрашивания хромосом [4]. После обработки 9-аминоакридином окрашивание стандартными красителями

ацетокармином и ацетоорсеином выявляет на прометафазных хромосомах большое число полос – окрашивание сходное по типу с G/R-бэндингом хромосом млекопитающих. С помощью этого метода проведена полная идентификация прометафазных хромосом в Mch геноме ромашки аптечной, в AD-геноме хлопчатника тонковолокнистого и в геноме гороха посевного. Построены количественные идиограммы OR-окрашивания хромосом. [6]. В результате исследования рисунков OR-окраски хромосом у разных сортов изученных видов растений обнаружена внутривидовая консервативность этого типа бэндинга, что делает OR-окрашивание хромосом растений еще более похожим на G/R-окраску хромосом животных. Сравнение рисунков C-окраски и OR-окраски хромосом растений обнаружило, что C-положительные районы хромосом не окрашиваются ацетоорсеином. Последовательное окрашивание хромосом растений ацетоорсеином, а затем AT-специфичным флуоресцентным красителем DAPI показало, что позитивно окрашенные OR-районы обычно не окрашиваются этими флуорохромами и наоборот [6, 9]. Известно, что DAPI – окрашивание хромосом животных аналогично G-окраске, следовательно, весьма вероятно, что OR-окраску хромосом растений можно отнести к R-типу.

Разработана методика, позволяющая с помощью бромдезоксигуанидина выявлять на хромосомах растений воспроизводимый рисунок ранней репликации, который характеризуется большим числом окрашенных сегментов [7]. На крупных хромосомах ячменя было выявлено слишком большое число полос, что затруднило их идентификацию. Это привело нас к заключению о нецелесообразности использования этого метода с целью идентификации хромосом у растений с богатым рисунком C-окраски хромосом, что не исключает ее использование для точного физического картирования хромосом. На мелких хромосомах хлопчатника, полученный рисунок RB_e – окрашивания дал возможность их распознавания. Это позволило идентифицировать и провести сравнение мелких хромосом в A и (AD)₂ геномах хлопчатников. Обнаруженное сходство распределения ранореплицирующихся районов по длине хромосом не только в A-геноме и A₂-субгеноме, но и в D₂-субгеноме хлопчатников показало, что у растений, также как и у животных, рисунок репликации хромосом достаточно консервативен.

В качестве дополнительных маркеров для идентификации хромосом используют рисунки распределения повторяющихся последовательностей ДНК, выявляемые с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). В качестве зондов могут быть использованы теломерные, центромерные повторы или сателлиты различной интеркалярной локализации, а также рибосомные гены.

Последовательности генов 45S и 5S рРНК очень консервативны поэтому при изучении их хромосомной локализации в качестве зондов обычно используют выделенные и клонированные последовательности рибосомных генов из генома пшеницы. Известно, что локализация рибосомных генов на хромосомах считается синапоморфным признаком, поэтому сравнительные исследования хромосомной локализации генов 45S и 5S рРНК, наряду со сравнительными исследованиями последовательностей межгенных спейсеров, успешно используется для исследования филогенетических взаимоотношений многих видов растений. Мы использовали этот подход для изучения происхождения льна [8].

Для идентификации хромосом при FISH-методе часто используют AT-специфичный флуоресцентный краситель DAPI. У растений на хромосомах небольших размеров выявляются рисунки DAPI-дифференциального окрашивания, которые практически совпадают с рисунками C-окраски. Изучена возможность применения десяти новых флуоресцентных красителей (димерные производные красителя Hoechst 33258, синтезированные в Институте молекулярной биологии РАН) для дифференциального окрашивания хромосом растений. При окрашивании этими флуорохромами на хромосомах льна выявлен рисунок по типу C\DAPI- дифференциального окрашивания. После окраски флуорохромами DB(8) и DB(17), рисунок был более контрастным, чем

после окраски DAPI, что дает основание предполагать перспективность использования двух новых АТ-специфичных флуорохромов в исследовании хромосом. [9].

Одновременное или последовательное использование в исследовании нескольких методов выявления на хромосомах молекулярно-цитогенетических маркеров позволяет успешно идентифицировать мелкие хромосомы. Кроме того, это дает возможность точно картировать на них определенные последовательности ДНК, установить наличие и тип хромосомных перестроек, локализовать точки разрывов, что необходимо при создании коллекций с перестроенными хромосомами и исследовании реорганизации кариотипов в процессе видообразования [8].

При анализе мелких хромосом особое значение приобретает оптимизация методов фиксации изображений хромосом и последующей их компьютерной обработки. Новые возможности по улучшению исследования самых мелких деталей рисунка дифференциального окрашивания хромосом отрывают методы цифровой обработки изображений. Среди них особое место занимают методы деконволюции изображений. Специализированные программы хромосомного анализа в значительной мере облегчают анализ кариотипов мелкохромосомных растений.

Работа поддержана грантами РФФИ 05-08-33607, 06-04-81007, 07-04-00268, 08-08-00391 и ПФИ «Динамика генофондов растений, животных и человека».

Выводы

1. Для увеличения разрешающей способности анализа мелких хромосом необходимо применение интеркаляторов ДНК, методик высокоразрешающего дифференциального окрашивания и FISH с различными маркерными последовательностями ДНК.

2. Оптимизация программно-аппаратного комплекса фиксации и анализа изображений позволяет успешно исследовать виды растений с мелкими хромосомами.

Литература

1. *Paterson AH, Bowers JE, Burow MD, Draye X, Elsiek CG, Jiang CX, Katsar CS, Lan TH, Lin YR, Ming R, Wright RJ.* Comparative genomics of plant chromosomes. *Plant Cell.* - 2000.- vol.12.- P.1523-1540.
2. *Gill N, Hans CS, Jackson S.* An overview of plant chromosome structure.// *Cytogenet Genome Res.*- 2008- vol.120,(3-4):194-201.
3. *Guerra M.* Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes// *Genetics and Molecular Biology* -2000.-V. 23, 4.- P.1029-1041
4. *Muravenko OV, Amosova AV, Samatadze TE, Popov KV, Poletaev AI, Zelenin AV.* 9-Aminoacridine: An efficient reagent to improve human and plant chromosome banding patterns and to standardize chromosome image analysis // *Cytometry.*- 2003- vol. 51.- P. 52-57.
5. *Попов К.В., Муравенко О.В., Саматадзе Т.Е., Амосова А.В., Зеленин А.В.* Особенности изучения гетерохроматических районов в мелких хромосомах растений // *Докл.РАН.*- 2001-Т.381 №4.- С.562-565
6. *Муравенко О.В., Саматадзе Т.Е., Зеленин А.В.* Компьютерный и визуальный анализ рисунка G-подобного бэндинга хромосом ромашки аптечной.// *Биологические мембраны* -1998- т.15, N 6.- С. 670-678
7. *Muravenko OV, Fedotov A.R., Punina E.O., Fedorova L.I., Grif V.G., Zelenin A.V.* Comparison of chromosome BrdU-Hoechst-Giemsa banding patterns of the A₁ and (AD)₂ genomes of cotton.- *Genome* 1998 –, vol. 41.- P. 616-625.
8. *Muravenko O. V., Yurkevich O. Yu., Bolsheva N. L., Samatadze T. E., Nosova I. V., Zelenina D. A., Volkov A. A., Popov K. V., Zelenin A. V.* Comparison of genomes of eight species of sections *Linum* and *Adenolinum* from the genus *Linum* based on chromosome banding, molecular markers and RAPD analysis // *Genetica* – 2009. – vol.135.- P.245–255.

9. *Попов К. В., Егорова Е. И., Иванов А. А., Громыко А. В., Жузе А. Л., Большева Н. Л., Юркевич О. Ю., Муравенко О. В., Зеленин А. В.* Димерные бисбензимидазольные красители на основе НОЕСНСТ 33258 – новые ДНК-специфичные флуорохромы для цитогенетики человека и растений.// Биологические мембраны - 2008 - том 25, № 3.- С. 173-180.
10. *Fukui K. and Mukai Y.* Condensation pattern as a new image parameter for identification of small chromosomes in plants Jap. J. Genetics - 1988 -vol.63 , No.40. P.359-366
11. *Саматадзе Т. Е., Муравенко О. В., Зеленин А. В.* Сравнение С-окрашенных хромосом в кариотипах трех видов рода *Matricaria* L.// Генетика – 1998- т. 34, № 12.- С. 1720-1724.

Резюме

Предложен подход к анализу кариотипов растений с небольшими хромосомами, который объединяет комплекс высокоразрешающих методов приготовления, окрашивания, физического картирования и анализа хромосом, позволяющий идентификацию хромосом, картирование хромосомных перестроек и исследование геномов мелкохромосомных растений в эволюции и селекции.

The approach to the analysis of small size chromosomes in plants has been developed. It combines high-resolution techniques of chromosome preparation, banding FISH and image analysis. Its application allows chromosome identification, mapping of chromosome rearrangements and comparative study of small-chromosome plant genomes in evolution and selection by the set of chromosome-molecular markers.

НАУМЕНКО В.Д., ГУЩА М.І., ДЯЧЕНКО А.І., ДМИТРІЄВ О.П.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Київ, 03143 вул.акад.Заболотного, 148, e-mail:dmyt@voliacable.com*

ВПЛИВ УФ-В ОПРОМІНЕННЯ ТА ПІДВИЩЕНОЇ ТЕМПЕРАТУРИ НА ФОРМУВАННЯ ТА АПЕРТУРУ ПРОДИХІВ У ОДНОДОЛЬНИХ ТА ДВОДОЛЬНИХ КУЛЬТУР

Зростання потоку УФ-В випромінювання, пов'язане зі зменшенням концентрації озону в атмосфері, приводить до посилення негативного впливу на всі живі організми. У багатьох видів рослин підвищені рівні УФ-В опромінення викликають зменшення фотосинтетичної активності і продуктивності, гальмування активності ферментів циклу Кребса і т.п. Відомо, що при УФ-В опроміненні листків спостерігається генерація активних форм кисню (АФК) [1], які беруть участь у димеризації нуклеотидів ДНК, ініціюють перекисне окиснення ліпідів, викликають утворення дисульфідних містків у білках і т.п. [2]. Припускають, що такі сполуки, як H₂O₂, NO, саліцилова (СК) та жасмонова кислоти (ЖК) діють як вторинні месенджери, які запускають реакції організму, які контролюються специфічними генами, у відповідь на дію УФ-В. При УФ-В опроміненні сигнальні системи запускають перебудову метаболізму опромінених тканин, що забезпечує відновлення пошкоджень та адаптацію до дії УФ-В радіації.

УФ-В опромінення справляє, також, істотний вплив на ріст та розвиток рослин і на багато фізіологічних процесів, зокрема, на моторику продохів (відкривання – закривання). Зміна функціональної активності продохового апарату листка є одним з найбільш важливих механізмів адаптації рослин до багатьох несприятливих факторів середовища, зокрема до посухи. У зв'язку з підвищенням рівня УФ-В опромінення та середньорічної температури докілья важливо з'ясувати його роль в адаптації рослин до УФ-В опромінення.