

Резюме

Рассматривается эволюция (макро- и микроэволюция, глобальный эволюционизм) в системе племенной работы. Обращается внимание на конверсионную способность животных превращать питательные вещества в продукцию.

Розглядається еволюція (макро- і мікроеволюція), глобальний еволюціонізм) у системі племінної роботи. Звертається увага на конверсійну здатність тварин перетворювати поживні речовини корму в продукцію.

The evolution (macro-and-micro evolution, global evolutionism) in the system of pedigree breeding has been considered. The conversion ability of animals, i.e. the ability to convert nutritive substance of feeds into the products, has been paid much attention to.

САМАТАДЗЕ Т.Е., ЗЕЛЕНИН А.В., МУРАВЕНКО О.В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова 32, e-mail:tsamatadze@gmail.com

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМОВ СОРТОВ И ЛИНИЙ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM L.*)

По своему значению для мирового растениеводства бобовые культуры занимают особое место среди сельскохозяйственных культур. К наиболее ценным и широко районированным бобовым культурам относят горох, фасоль, люпин, люцерна и они широко используются в качестве модельных объектов для исследований. Однако, даже у классического объекта исследований - гороха посевного до недавнего времени не было полной цитологической идентификации хромосом в геноме и отсутствовало соответствие генетической и цитологической классификаций хромосом (*Blixt, 1958; Neumann et al., 2001; 2002; Саматадзе и др., 2002, 2005*). Только с помощью высокоразрешающего дифференциального окрашивания хромосом гороха удалось их полностью идентифицировать и даже точно локализовать расположение генов 5S рРНК, а также точки разрывов хромосом в некоторых транслокационных линиях (*Саматадзе и др., 2005*). В настоящее время точная идентификация хромосом гороха, а также соответствие цитологической и генетической номенклатур его хромосом подтверждено с помощью FISH с различными tandemными повторами (*Macas et al., 2007*). Эти примеры показывают, насколько важно и информативно использование большого числа хромосомных маркеров для глубокого изучения и точного физического картирования хромосом в геномах бобовых культур.

Целью данного исследования явилось сравнительное цитогенетическое исследование сортов и линий гороха посевного с использованием C-/Ag-ЯОР-дифференциального окрашивания, а также флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили сорта и линии гороха посевного, полученные из коллекции ВНИИСХМ г. Санкт-Петербурга. Три сорта зернового гороха: Frisson, Sparkle, Rondo и один сорт овощного гороха- Finale, а также 2 линии: Sprint-2 и SGE. Исследование дифференциальных рисунков митотических хромосом гороха (C-/Ag-ЯОР-окраска), двухцветный FISH проводили по описанным ранее методикам (*Саматадзе, 2002, 2005*). Анализ метафазных пластинок и регистрацию изображений проводили с помощью черно-белой ПЗС камеры CoolSnap (Roper Scientific, США), установленной на флуоресцентном микроскопе Leitz Wetzlar.

Измерения хромосом и построение идиограмм проводили с помощью программы анализа изображения Карио 1.5 (ВидеоТест, Санкт-Петербург). Для каждого образца анализировали не менее 15-30 полных метафазных пластинок.

Результаты и обсуждения

Сравнительное исследование рисунков С-дифференциально окрашенных хромосом изучаемых сортов и линий гороха показало сходство их рисунков. На хромосомах выявлялось небольшое количество гетерохроматина, в основном прицентромерной локализации. Установлено, что в кариотипах сортов и линий гороха наблюдается хромосомный полиморфизм по размеру бэндов на спутничных хромосомах. У всех сортов зернового гороха был выявлен крупный С-бэнд на 4 хромосоме и среднего размера блок гетерохроматина, локализованный на спутнике и в районе приспутничной нити на 7 хромосоме. У линий и у сорта овощного гороха Finale на этих же хромосомах С-блоки были меньшей интенсивности окраски и практически сходного размера. Распределение С-бэндов по хромосомам в кариотипах сортов и линий гороха позволило определить все семь гомологичных пар. По морфологии и рисунку С-бэндинга были идентифицированы хромосомы с 1 по 7 в соответствие со стандартной номенклатурой Бликста и разработанной нами ранее номенклатурой (Саматадзе и др., 2002).

FISH-анализ с пробой рТа 71 выявил наличие двух сайтов 45S рДНК в районах вторичных перетяжек на спутничных хромосомах 4 и 7. В случаях, когда спутничная нить четко выражена, можно обнаружить, что сигнал гибридизации на хромосоме 4 локализуется в районе спутничной нити и в спутнике, а на хромосоме 7 – в спутничной нити и проксимальнее ее в районе приспутничного гетерохроматина. Как было показано ранее, хромосомы 4 и 7 различаются морфологически и по размеру спутника, который обладает большими размерами на хромосоме 7. Размеры гибридизационных сигналов 45S рДНК на хромосоме 4 были меньше, чем на хромосоме 7 в кариотипах всех изучаемых сортов. У линий гороха сайты 45S рДНК на обеих спутничных хромосомах были схожими с размером сигнала на хромосоме 4 у других изученных сортов. Таким образом, наблюдается межсортовой полиморфизм у гороха по размерам сайтов рибосомных генов на 4 и 7 хромосомах, что подтверждается в предыдущих исследованиях (Саматадзе и др., 2005). Размеры сайтов 45S рДНК на обеих спутничных хромосомах у сортов и линий могут быть приблизительно одинаковыми, однако, в некоторых случаях, на хромосоме 7 выявляется более крупный сайт у сортов, в то время, как у линий гороха сайты 45S в основном одинакового размера.

Транскрипционную активность генов 45S рРНК выявляли с помощью метода окрашивания азотнокислым серебром (Ag-ЯОР). Анализ рисунка Ag-ЯОР-окрашивания у всех образцов гороха выявил наличие Ag-положительных районов в области вторичных перетяжек на спутничных хромосомах 4 и 7. На хромосоме 7 всегда наблюдался более крупный Ag-ЯОР. Поскольку ранее было показано, что размеры Ag-ЯОР коррелируют с функциональной активностью, расположенных в этом районе рибосомных генов, то можно предположить большую функциональную активность ЯОР хромосомы 7 по сравнению с ЯОР хромосомы 4. В интерфазных ядрах изученных образцов гороха при этом наблюдалось также не более четырех Ag-окрашенных ядрышек.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) с пробой рТа 794 показала три сайта 5S рРНК генов. Один сайт локализован в субтеломерном районе 4.3 короткого плеча хромосомы 1, второй - в медианном районе 4 короткого плеча хромосомы 3 и третий - в проксимальном районе 2 короткого плеча хромосомы 5. Общая картина распределения сигналов по их интенсивности на 1, 3 и 5 хромосомах сохраняется во всех изученных сортах и согласуется с результатами других исследователей, которые на хромосомах гороха картировали три сайта 5S генов (Ellis et al 1988; Hall et al., 1997a; Neumann et al., 2001; Саматадзе и др., 2005). Было показано, что наиболее

крупный сайт 5S генов располагается на хромосоме 5, а сайты меньшего размера локализованы в дистальной части метацентрической хромосомы 1 и на хромосоме 3 либо в медианной (Hall et al., 1997a), либо в прителомерной части (Ellis et al., 1988; Neumann et al., 2001; Саматадзе и др., 2005).

Выводы

1. Проведено сравнительное цитогенетическое изучение кариотипов 4 сортов и 2 линий гороха посевного с использованием С-/Ag-ЯОР- дифференциального окрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ*.

2. Выявлены различия рисунков С-окраски на спутничных хромосом в кариотипах сортов разного направления селекции.

3. Уточнена локализация сайтов гибридизации 5S и 45S рДНК и установлен межсортовой полиморфизм по размерам сайтов рибосомных генов на 4 и 7 хромосоме.

4. Показана возможность применения методов хромосомного анализа для паспортизации линий и сортов гороха.

Работа поддерживалась грантом РФФИ 07-04-13553.

Литература

1. Blixt S. Cytology of Pisum II. The normal karyotype. // Agric. Hort. Genet. -1958. vol. 16.- P. 221-237.
2. Neumann P., Nouzova M., Macas J. Molecular and cytogenetic analysis of repetitive DNA in pea (*Pisum sativum* L.). // Genome. 2001. vol. 44.- P. 716-728.
3. Neumann P., Pozarkova D, Vrana J, Dolezel J, Macas J. Chromosome sorting and PCR-based physical mapping in pea (*Pisum sativum* L.). // Chrom. Res. 2002. vol.10, P. 63-71.
4. Саматадзе Т.Е., Муравенко О.В., Зеленин А.В., Гостимский С.А. Идентификация хромосом генома гороха (*Pisum sativum* L.) по рисунку С-окраски. // Доклады Академии Наук. -2002.- т. 387. N 5.- С.714-717.
5. Саматадзе Т.Е., Муравенко О.В., Большева Н.Л., Амосова А.В., Гостимский С.А., Зеленин А.В. Изучение хромосом сортов и транслокационных линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с использованием FISH, Ag-ЯОР и DAPI- дифференциального окрашивания. // Генетика.-2005.- N 12.- С. 1665 – 1673.
6. Macas J., Neumann P., Navratilova A. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. // BMC Genomics.- 2007. vol. 8, N 427.- p. 1-16.
7. Ellis T.H.N., Lee D., Thomas C.M., Simpson P.R., Cleary W.G., Newman M.A., Burcham K.W.G. 5 S Ribosomal RNA genes in *Pisum* – sequence, long-range and chromosomal organization. // Mol. Gen. Genet. -1988.- vol. 214, P. 333-342.
8. Hall K.J., Parker J.D., Ellis T.H.N. The relationship between genetic and cytogenetic maps of pea. I. Standard and translocation karyotypes. // Genome.- 1997.- vol. 40.-P. 744-754.

Резюме

С помощью С-/Ag-ЯОР-дифференциального окрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) проведено изучение кариотипов 4 сортов и 2 линий гороха посевного. Показана перспективность использования данных методов цитогенетического анализа для разработки методических подходов и принципов составления хромосомных паспортов.

C- and Ag-NOR-staining techniques and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were used to study karyotypes of four varieties and two lines of pea. It was shown that these comparative cytogenetic analysis methods were rather perspective for the development of methodical approaches and principles of making chromosome passports.