

С.А. ХОХЛОВА, А.П. БЫЧЕНКО,
А.В. ГАЙНУДИНОВ, И.А. ГОРДЕЙ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫХ С-БЛОКОВ ХРОСОМ ГЕНОМА РЖИ У РЖАНО-ПШЕНИЧНЫХ АМФИДИПЛОИДОВ И ИХ ХРОСОМНО-ЗАМЕЩЕННЫХ ЛИНИЙ



Изучали полиморфизм гетерохроматиновых С-блоков хромосом ржаного генома у ржано-пшеничных амфидиплоидов — секалотритикум (Верасень × Л374, Новосибирская × Л246), гибридов F₁BC₁ ((Верасень × Л374) × Л145 × Л145), D/A-замещенных линий (линия 118 (Новосибирская × Л246) × Reso × Reso, линия 104 ((Верасень × Л374) × Гармония × Гармония) с целью выявления цитогенетических маркеров ржаных хромосом. Показано увеличение полиморфизма по наличию и величине гетерохроматиновых блоков хромосом ржаного генома у гибридов F₁BC₁ и нестабильных генотипов хромосомно-замещенных линий F₆BC₁, что связано с активацией мобильных генетических элементов, присутствующих у злаков. Выявлены гетерохроматиновые маркеры всех семи хромосом ржаного генома. Система полиморфизма гетерохроматиновых блоков может служить маркером специфичности линейной структуры хромосом в процессе реконструкции синтетических геномов хлебных злаков, а также тестом на цитологическую и морфогенетическую стабильность гибридных полигеномов в ряду поколений.

© С.А. ХОХЛОВА, А.П. БЫЧЕНКО, А.В. ГАЙНУДИНОВ,
И.А. ГОРДЕЙ, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 3

Введение. Интрогрессивная гибридизация хлебных злаков позволяет проводить геномную и хромосомную реконструкцию кариотипов с целью создания качественно нового селекционного материала. Для изучения закономерностей и механизмов преобразования геномов необходим поиск молекулярных и цитологических маркеров для идентификации хромосом у интрогрессивных линий, в качестве которых могут быть использованы гетерохроматиновые маркеры.

В геномах высших организмов гетерохроматин может быть представлен полным набором хромосом одного из родителей, отдельными хромосомами (добавочная В-хромосома) или отдельными участками хромосом. Многочисленные цитологические данные свидетельствуют о наличии в хромосоме как прицентромерного, так и теломерного гетерохроматина, причем величина гетерохроматиновых блоков широко варьирует даже в пределах одной популяции, что связано с их полиморфизмом [1–6]. Плотность генов в гетерохроматине в 100 раз меньше, чем в эухроматине [7]. Однако, несмотря на низкую активность гетерохроматина у высших растений, он обладает целым рядом функциональных особенностей: оказывает влияние на частоту и местоположение хиазм, а значит, и на рекомбинацию генов; расширяет свое неактивное состояние на эухроматиновые районы, перенесенные к гетерохроматину хромосомными перестройками — эффект мозаичного типа; изменяет время экспрессии морфогенетических признаков; вызывает функциональную реорганизацию генома при перераспределении гетерохроматина; участвует в регуляции клеточного деления, роста и параметров индивидуального развития организма, в регуляции транскрипции и трансляции, в структурной стабилизации геномов в процессе репликации; служит маркером линейной структуры хромосом генома.

Прицентромерный гетерохроматин содержит большое количество высоко и умеренно повторенных последовательностей, которые часто представлены мобильными элементами. Особенности регуляции позволяют им нормально экспрессироваться в окружении «молчащего» гетерохроматина.

Изменение уровней полиморфизма по гетерохроматиновым блокам (выше или ниже их критических порогов) сопровождается функ-

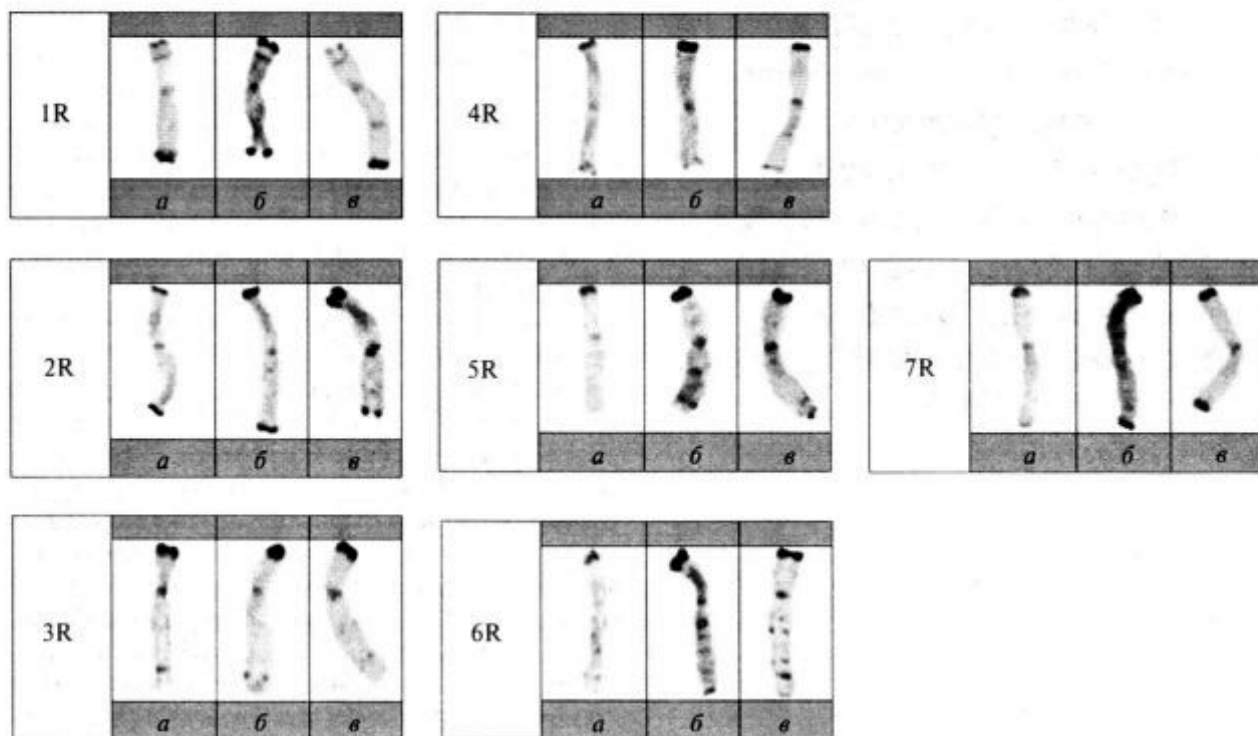


Рис. 1. Полиморфизм гетерохроматиновых блоков R-генома у исходных секалотритикум и хромосомно-замещенных (D/A) линий: *a* — секалотритикум Верасень × Л374; *б* — хромосомно-замещенная линия 104; *в* — гибрид F_1BC_1 (Верасень × Л374) × Л145 × Л14

ционально значимыми изменениями онтогенеза. Степень активности гетерохроматина находится под геномным контролем, а его перераспределение связано с функциональной реорганизацией генома, затрагивающей фенотипическое проявление отдельных признаков.

С помощью метода дифференциального окрашивания хромосом (С-бэндинг) возможно локализовать гетерохроматиновые блоки с высокоповторяющимися последовательностями нуклеотидов независимо от их организации и функции. В большинстве случаев эти блоки являются структурным гетерохроматином, распределение которого по всей длине хромосомы определяет ее структурно-морфологическую индивидуальность.

Материал и методы. В эксперименте для цитогенетического анализа были использованы ржано-пшеничные амфидиплоиды — секалотритикум (Верасень × Л374, Новосибирская × Л246), гибриды F_1BC_1 ((Верасень × Л374) × Л145 × Л145) и хромосомно-замещенные линии F_6BC_1 (линия 118 (Новосибирская × Л246)

× Reso × Reso, линия 104 (Верасень × Л374) × Гармония × Гармония), находящиеся на разных этапах генетической стабилизации.

Гибрид F_1BC_1 (Верасень × Л374) × Л145 × Л145 — цитологически (уровень хромосомных нарушений в мейозе достигал 93%) и морфогенетически (расщепление растений по высоте) нестабилен. Хромосомно-замещенная линия 104 (F_6BC_1 , 1D/1A) цитологически и морфогенетически стабильна. Хромосомно-замещенная линия 118 (F_6BC_1 , 2D/2A) цитологически (уровень хромосомных нарушений в мейозе достигал 53 %) и морфогенетически (расщепление растений по высоте) нестабильна.

Замещенные линии секалотритикум получали путем интрогрессивной гибридизации ржано-пшеничных амфидиплоидов (RRAABB, $6x = 42$) с мягкой пшеницей (AABBDD, $6x = 42$). Идентификацию хромосом ржаного генома исходных форм ржано-пшеничных амфидиплоидов Верасень × Л374, Новосибирская × Л246 и их хромосомно-замещенных линий с

D/A-замещениями хромосом проводили по наличию С-блоков в определенных позициях. Полиморфизм гетерохроматиновых блоков генома ржи у хромосомно-замещенных линий изучали в сравнении с исходными ржано-пшеничными амфидиплоидами на дифференциально окрашенных препаратах с помощью обобщенных идиограмм, составленных в программе Кариомастер.

Результаты исследований и их обсуждение. Полиморфизм гетерохроматиновых блоков хромосом в контрольных и опытных вариантах обусловлен вариабельностью размеров теломерного гетерохроматина и наличием или отсутствием мелких и крупных интеркалярных гетерохроматиновых участков, расположенных по всей длине хромосомы.

У цитологически нестабильных гибридов F_1BC_1 , полученных в скрещиваниях (Верасень \times Л374) \times Л145 \times Л145, уровень хромосомных нарушений достигал 93 %, фертильность пыльцы — 17,5 %. Для всех хромосом ржаного генома гибридов характерен определенный полиморфизм гетерохроматиновых блоков (рис. 1, б, в). Спутничная 1R хромосома имеет слабо выраженный блок в спутнике и коротком плече, который является цитологическим маркером, унаследованным от материнской формы, а также крупный теломерный блок в длинном плече и небольшой блок приадрешкового гетерохроматина, полиморфный по размеру. В проксимальной части длинного плеча отсутствует ярко выраженный блок гетерохроматина, характерный для исходных секалотритикум.

Для 2R хромосомы характерно присутствие двух дополнительных интеркалярных блоков гетерохроматина в коротком и длинном плечах.

В коротком плече 3R хромосомы выявлен крупный теломерный блок, а в длинном плече показано отсутствие С-бэнда, характерного для исходных секалотритикум.

4R и 5R хромосомы имеют по два ярко окрашенных блока гетерохроматина в длинном плече, не выделяемых у секалотритикум Новосибирская \times Л246.

У 6R хромосомы гибрида гетерохроматин в коротком плече утерян, а в длинном плече вместо пяти присутствуют четыре блока с различной степенью окрашивания.

Для 7-й метацентрической хромосомы ржаного генома гибрида F_1BC_1 характерно отсутствие гетерохроматина в обоих плечах в сравнении с исходной линией, в длинном плече которой в дистальном положении выявляется полиморфный по размеру блок.

Вышеупомянутые особенности присутствия/отсутствия и перераспределения блоков были характерны для всех анализируемых образцов гибрида F_1BC_1 .

Анализ полиморфизма гетерохроматина у цитологически и морфогенетически стабильной хромосомно-замещенной линии 104 в сравнении с исходной формой (Верасень \times Л374) \times Гармония \times Гармония не выявил существенных различий по рисунку гетерохроматиновых блоков у гомологичных хромосом ржаного генома (рис. 1, б).

Хромосомы 1R—5R у замещенной и исходной линий по рисунку гетерохроматина были аналогичными, для 6R хромосомы характерен дополнительный блок в длинном плече.

Крупная метацентрическая хромосома 7R линии 104 характеризовалась наличием крупного теломерного блока гетерохроматина в длинном плече, слабо выраженного у исходной формы Верасень \times Л374.

В целом положение крупных С-бэндов в гомологичных хромосомах исходной линии и ее замещенной формы было аналогичным, незначительный полиморфизм затрагивал в основном интеркалярные блоки, что, по-видимому, обуславливало характерные морфобиологические особенности анализируемой линии.

У цитологически и морфогенетически нестабильной хромосомно-замещенной линии 118 (Новосибирская \times Л246) \times Reso \times Reso (F_6BC_1) уровень хромосомных нарушений достигал 52,6 %. Присутствие семи хромосом генома ржи и D/A-замещение обуславливало морфотип колоса исходных секалотритикум. Кариотип этой линии содержит специфичные полиморфные варианты хромосом 1R—6R (рис. 2, б). В интеркалярном участке длинного плеча хромосом 1R, 4R и 5R выявлен полиморфный по размеру С-бэнд, отсутствующий у исходной линии секалотритикум. Для хромосом 4R и 5R он является маркерным.

Характерной особенностью 2R хромосомы линии 118 был дополнительный интеркаляр-

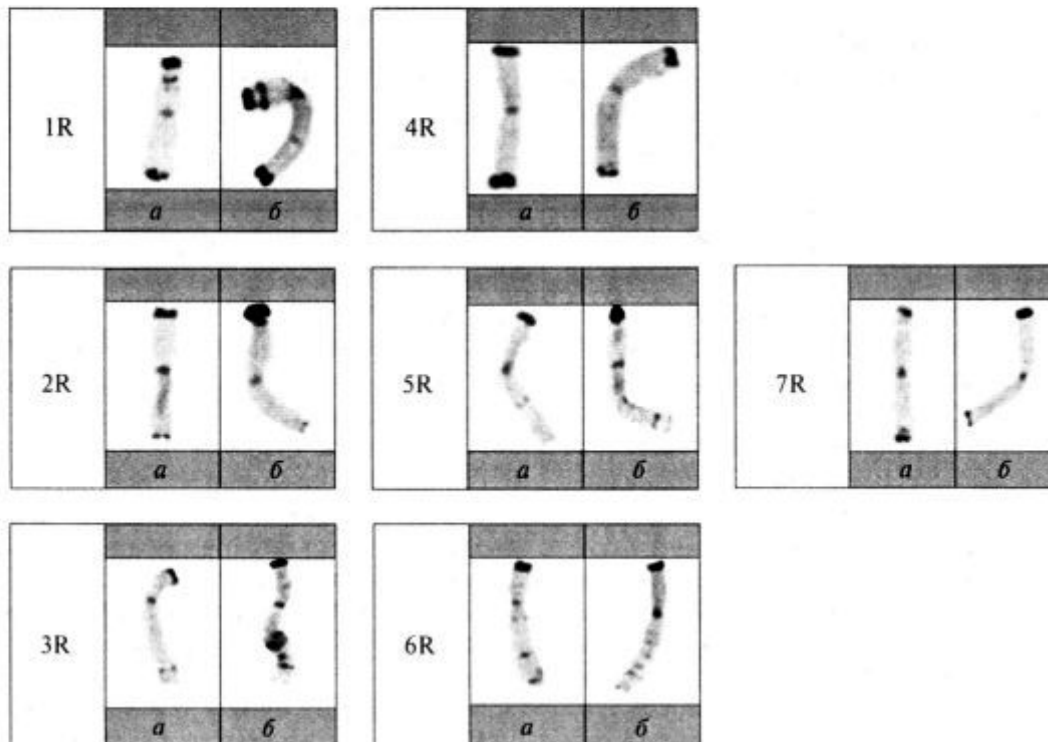


Рис. 2. Полиморфизм гетерохроматиновых блоков R-генома у исходных секалотритикум и хромосомно-замещенных (D/A) линий: а — секалотритикум Новосибирская × Л-246; б — хромосомно-замещенная линия 118

ный блок гетерохроматина в коротком плече и более мелкие теломерные блоки в обоих плечах в сравнении с исходной линией.

У 3R хромосомы замещенной линии 118 вблизи теломеры короткого плеча расположен одиночный, ярко окрашенный блок, являющийся цитологическим маркером для этой хромосомы.

Характерной особенностью 4R хромосомы было наличие дополнительного субтерминального блока в длинном плече хромосомы, являющегося цитологическим маркером.

Отличительной особенностью 5R хромосомы явилось присутствие трех интеркалярных блоков в длинном плече, два из них находились в субтерминальном положении.

Характерными для 6R хромосомы замещенной линии 118 были два интеркалярных С-бэнда в коротком плече, а также дополнительный интеркалярный блок гетерохроматина в длинном плече.

7R хромосома замещенной линии 118 по рисунку гетерохроматиновых блоков была аналогичной 7R хромосоме исходной формы Новосибирская × Л246.

Причина перераспределения гетерохроматина — мобильные генетические элементы, результатом чего являются макромутации [8, 9]. Мобильные генетические элементы двойным образом могут влиять на реализацию наследственной информации в развитии организма: внедряясь в область структурного гена, они изменяют скорость транскрипции или временное проявление экспрессии генов, что также оказывает влияние на морфогенетические процессы. Перемещения мобильных элементов способствуют появлению инверсий и транслокаций, как правило, сопровождающих видообразование. Кроме того, мобильные генетические элементы, внедряясь в область структурного гена, могут изменять скорость транскрипции. Перераспределение гетерохроматина вызывает функциональную реорганизацию генома в целом, затрагивающую либо отдельные признаки, либо изменяющую фенотипическое проявление совокупности признаков [10].

В свою очередь, процессы транскрипции являются основным элементом системы ре-

гуляции экспрессии генов. При этом количество гетерохроматина должно быть оптимальным.

Увеличение количества гетерохроматина выше оптимального оказывает отрицательное влияние на процессы кроссинговера и мейоз, что способствует цитологической нестабильности генотипов. У генетически нестабильных форм — гибриды F_1BC_1 и нестабильные хромосомно-замещенные линии — наблюдали повышенное содержание гетерохроматина. Однако по мере стабилизации в поколениях отмечали его последовательное снижение до оптимального уровня стабильного генотипа, в нашем случае — материнских форм ржано-пшеничных амфидиплоидов секалотритикум. При количестве гетерохроматина ниже оптимального уровня нарушаются процессы стабилизации транскрипции, что в конечном счете также приводит к генетической нестабильности.

Таким образом, показано, что при межгеномном замещении хромосом пшеницы (D/A-замещения) у ржано-пшеничных амфидиплоидов секалотритикум происходят изменения гетерохроматиновых C-блоков хромосом ржаного генома, не вовлеченных в замещения, т.е. межгеномные замещения отдельных хромосом вызывают изменения линейной структуры гетерохроматина во всем геноме.

Для цитологически и морфогенетически нестабильных генотипов замещенных линий секалотритикум характерно увеличение полиморфизма гетерохроматиновых блоков по всем хромосомам ржаного генома, проявляющееся в возникновении дополнительных, в основном интеркалярных блоков, что можно объяснить активацией мобильных генетических элементов, способствующих появлению инверсий и транслокаций и оказывающих влияние на систему регуляции экспрессии генов, а также приводящих к генетической нестабильности организма. Система полиморфизма гетерохроматиновых блоков может служить маркером специфичности линейной структуры хромосом в процессе формирования и реконструкции синтетических геномов хлебных злаков, а увеличение полиморфизма гетерохроматина в ржаном геноме D/A-хромосомно-замещенных линий секалотритикум — тестом на цитологическую и морфогенетическую стабильность гибридного полигенома в ряду поколений.

кум — тестом на цитологическую и морфогенетическую стабильность гибридного полигенома в ряду поколений.

SUMMARY. Polymorphism of heterochromatin C-blocks in chromosomes of rye genome has been studied in the F_1BC_1 hybrids and the D/A substitution lines of rye-wheat amphidiploids (Verasen \times L374, Novosibirskaya \times L246) — secalotriticum for revealing cytogenetic markers of rye chromosomes. An increase in polymorphism for the presence and value of heterochromatin blocks in chromosomes of rye genome was shown in the F_1BC_1 hybrids ((Verasen \times L374) \times L145 \times L145) and unstable genotypes of the F_1BC_1 chromosome substitution lines (line 118 (Novosibirskaya \times L246) \times Reso \times Reso), line 104 ((Verasen \times L374) \times Garmoniya \times Garmoniya) that was related to activation of mobile genetic elements present in cereals. Heterochromatin markers of all seven chromosomes in rye genome were revealed. The polymorphism system of heterochromatin blocks may serve as a marker for specificity of the linear chromosome structure during reconstruction of synthetic cereal genomes, and as a test for cytological and morphogenetic stability of hybrid polygenomes in a series of generations.

РЕЗЮМЕ. Вивчали поліморфізм гетерохроматинових C-блоків хромосом житнього геному у житньо-пшеничних амфідиплоїдів — секалотритікум (Верасень \times Л374, Новосибірська \times Л246), гібридів F_1BC_1 ((Верасень \times Л374) \times Л145 \times Л145), D/A-заміщених ліній (лінія 118 (Новосибірська \times Л246) \times Reso \times Reso), лінія 104 ((Верасень \times Л374) \times Гармонія \times Гармонія) з метою вивчення цитогенетичних маркерів житніх хромосом. Показано збільшення поліморфізму за наявності та величиною гетерохроматинових блоків житнього геному у гібридів F_1BC_1 та нестабільних генотипів хромосомно-заміщених ліній F_1BC_1 , що пов'язано з активацією мобільних генетичних елементів, які присутні у злаків. Виявлено гетерохроматинові маркери всіх семи хромосом житнього геному. Система поліморфізму гетерохроматинових блоків може слугувати маркером специфічності лінійної структури хромосом в процесі реконструкції синтетичних геномів хлібних злаків, а також тестом на цитологічну та морфогенетичну стабільність гібридних полігеномів в ряді поколінь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бадаева Е.Д. Молекулярно-цитогенетическое изучение хромосомного полиморфизма *Aegilops crassa* // Генетика. — 1997. — 33, № 5. — С. 635—643.
2. Семенов В.И., Семенова Е.В. Полиморфизм ржаных хромосом по гетерохроматиновым блокам у некоторых сортов ржи и тритикале // Генетика. — 1982. — 18, № 11. — С. 1856—1866.

3. Жимулев И.Ф., Беляева Е.С. Гетерохроматин, эффект положения гена и генетический сайленсинг // Генетика. — 2003. — **39**, № 2. — С. 187—201.
4. Вишнякова Х.С., Бадаева Е.Д., Зеленин А.В. Изучение внутривидового полиморфизма по рисунку С-окрашивания хромосом // Генетика. — 1997. — **33**, № 5. — С. 623—627.
5. Михайлова Е.И., Соснихина С.П., Нерушева Г.В., Фам Тхань Фьонг. Исследование генетических маркеров хромосом в генетическом анализе у ржи *Secale cereale* // Генетика. — 1994. — **30**, № 1. — С. 85—91.
6. Friebe В., Mukai Y., Gill B.S. C-banding polymorphisms in several accessions of *Triticum tauschii* (*Aegilops squarrosa*) // Genome. — 1992. — **35**, № 2. — P. 192—199.
7. Adams M.D., Celniker S.E., Holz K.A. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster* // Science. — 2000. — **287**. — P. 2185—2195.
8. Корочкин Л.И. Эволюционное значение первичных генетических элементов // Цитология и генетика — 1983. — **17**, № 3. — С. 67—75.
9. Evgeniev M., Irmikolopov G., Peunova N., Ilgin Y. Transposition of mobile genetic elements in interspecific hybrids of *Drosophila* // Chromosoma. — 1983. — **85**. — P. 375—386.
10. Корочкин Л.И. Связь онто- и филогенеза в генетическом освещении. Проблема макромутаций (морфологический и молекулярный аспекты) // Генетика. — 2002. — **38**, № 6. — С. 727—738.

Поступила 01.07.05