

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБОУ ВПО «КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Агрономический факультет
Кафедра генетики, селекции и семеноводства

ЦИТОГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

Курс лекций

для аспирантов по программе подготовки
06.06.01 – Биологические науки
35.06.01 – Сельскохозяйственные науки

Краснодар
КубГАУ
2015

Составитель: Цаценко Л. В.

ЦИТОГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ: курс лекций / сост.
Л. В. Цаценко. – Краснодар : КубГАУ, 2015. – 31 с.

Курс лекций предназначен для аспирантов по направлению подготовки 06.06.01– биологические науки, 35.06.01 – сельское хозяйство.

Рассмотрено и одобрено методической комиссией агрономического факультета _____ г., протокол №

Председатель методической
комиссии

В. П. Василько

© Цаценко Л. В., 2015

© ФГБОУ ВПО «Кубанский
государственный аграрный университет», 2015

Тема 1

История цитогенетики. Характеристика базовых этапов и объектов исследования

Цитогенетика – один из основных разделов общей генетики. Предмет исследований - хромосома, детерминирующая признаки и свойства организмов, их передачу при вегетативном и половом размножении.

В цитогенетических исследованиях используют цитогенетический подход, основанный на создании специальных генетических и цитогенетических моделей для исследования. Цитогенетика, наука, изучающая особенности воспроизведения, рекомбинации, изменения и функционирования генетически значимых структур клетки, их распределение в митозе, мейозе и при оплодотворении в зависимости от их числа и генетического строения.

Тема 2 – 3

Строение, функции, типы и кариология хромосом. Методы анализа

Хромосома – постоянный компонент ядра, отличающийся особой структурой, индивидуальностью, функцией и способностью к самовоспроизведению, что обеспечивает их преемственность и тем

самым передачу наследственной информации от одного поколения растительных и животных организмов к другому. У хромосом различают несколько функций: Информационная, Транскрипционная, Структурно-организационная, Сегрегационная, Рекомбинационная. Структурные части хромосомы: центромера, кинетохор, теломера. Существует несколько типов хромосом: кольцевые, В-хромосомы, телоцентрические, акроцентрические.

Функции хромосом:

1. Информационная – содержит ДНК, в которой находятся качественно различные гены, составляющие геном организма.

2. Транскрипционная – с ДНК генетическая информация переписывается на матричную РНК, которая переносит ее из ядра в цитоплазму.

3. Структурно-организационная – обеспечивает исключительно точное воспроизведение хромосом при репликации и идентичность дочерних хромосом, расходящихся к полюсам.

4. Сегрегационная – обеспечивает распределение хромосом по полюсам в разные споры или гаметы при мейозе.

5. Рекомбинационная – обеспечивает значительную часть комбинативной изменчивости – рекомбинацию сцепленных генов.

Кариология хромосом. Морфологию митотических хромосом лучше всего изучать в момент их наибольшей конденсации – в метафазе и в начале

анафазы. Хромосомы животных и растений в этом состоянии представляют собой палочковидные структуры разной длины с постоянной толщиной.

У большей части хромосом легко удается найти зону первичной перетяжки, которая делит хромосому на два плеча. В области первичной перетяжки находится центромер, где расположен кинетохор; к нему подходят пучки микротрубочек митотического веретена, идущие в направлении центриолей. Эти пучки микротрубочек принимают участие в движении хромосом к полюсам клетки при митозе. Некоторые хромосомы имеют вторичную перетяжку, которая обычно расположена вблизи дистального конца хромосомы и отделяет маленький участок, спутник. Вторичную перетяжку называют, кроме того, ядрышковым организатором, так как именно на этом участке хромосом в интерфазе происходит образование ядрышка. Плечи хромосом оканчиваются теломерами – конечными участками. Теломерные концы хромосом не способны соединяться с другими хромосомами или фрагментами.

Размеры хромосом у разных организмов варьируют в широких пределах. Длина хромосом может колебаться от 0,2 до 50 мкм. Число хромосом у различных объектов также значительно колеблется, но характерно для каждого вида животных или растений.

Кариотип – хромосомный комплекс вида со своими особенностями:

- числом и размером хромосом;
- их морфологией;
- наличием под световым микроскопом деталей строения, перетяжек, спутников,
- соотношением плеч, чередованием эу- и гетерохроматина.

Важнейшим свойством кариотипа является наличие пар гомологичных хромосом.

Тема 3-4

Мейоз – как механизм полового размножения. Генетический контроль мейоза. Техника давленых препаратов

МЕЙОЗ – тип деления, свойственный клеткам генеративных органов. Он предшествует или сопровождает образование половых и клеток – ГАМЕТ.

1) Основная его функция определяется названием – «мейоз» - редукция, уменьшение. Число хромосом в клетках в результате мейотического деления уменьшается вдвое и становится равным « n », т.е. ГАПЛОИДНЫМ. Типы мейоза: Зиготный (исходный) мейоз – происходит в зиготе, т.е. непосредственно после оплодотворения. Характерен для организмов, в жизненном цикле которых преобладает гаплоидная фаза.

2) Гаметный (терминальный) мейоз – происходит во время формирования гамет. Наблюдается у многих многоклеточных животных, а также среди простейших и некоторых низших растений, в жизненном цикле которых преобладает диплоидная фаза.

3) Промежуточный (споровый) мейоз – протекает во время спорообразования у высших растений, включаясь между стадиями спорофита (растения) и гаметофита (пыльца, зародышевый мешок). Выделяют 7 ключевых событий мейоза: вступление в мейоз; конъюгация гомологичных хромосом; мейотическая рекомбинация; хиазмообразование; расхождение гомологов; цитокинез; второе деление мейоза.

Типы нарушений в мейозе. Неравномерное расхождение хромосом к полюсам в анафазе I.

Образование женских и мужских гамет с разным числом хромосом и как следствие различная жизнеспособность гамет. Чаще гибнут мужские гаметы с несбалансированным числом хромосом, а при нормальном оплодотворении – появляются анеуплоидные растения.

В анафазе I задержка унивалентов (одного или нескольких) на экваторе.

Образование микроядер в диаде микроспор и макроспор, образование хромосомных и хроматидных мостов, а также нарушение функций веретена деления.

Нарушение процесса мейоза во время второго деления. Появление отстаивание хромосом, мостов, фрагментов, многополюсность.

Часто в пределах одного пыльника встречаются клетки, находящиеся в стадиях от диакинеза до тетрад, наблюдается асинхронность деления.

Возникновение дефективных тетрад. Это тетрады с различным числом микроядер, образование полиад – пентад, гексад.

Тема 6-7

Базовые методы цитогенетики. FISH-окраска. Молекулярная цитогенетика

Десять-пятнадцать лет назад возможности исследователя были практически сведены к изучению морфологии и дифференциальной окрашиваемости хромосом и их отдельных районов. Развитие методов, способных на цитологических препаратах визуализировать интересующие последовательности ДНК, резко изменило ситуацию. Монохромное окрашивание - в основе окрашивания лежит химическое взаимодействие красящих реактивов (напр. Реактив Шиффа). Методы дифференциального окрашивания позволяют выявить специфический рисунок каждой хромосомы. При разных методах окрашивания может проявляться разный рисунок хромосом. В большинстве случаев методики хорошо воспроизво-

димы, а рисунок исчерченности хромосом является видоспецифичным.

Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации оказался крайне эффективным инструментом изучения генома человека и других видов млекопитающих, реорганизации хромосом в ходе эволюции, анализа хромосомных перестроек как при малигнизации клеток, так и при врожденных патологиях. С его помощью были получены оригинальные данные по организации интерфазного ядра. Возник новый раздел цитогенетики – интерфазная цитогенетика. В настоящее время редкое исследование, требующее анализа хромосом, обходится без использования FISH .

Виртуальное окрашивание - этот тип анализа сравним с геномной гибридизацией. Имеющиеся зонды внедряют (миллионы проб) внедряют в комплементарные интересующиеся районы ДНК. По эффекту наложения можно судить о совпадении анализируемых районов или при их отсутствии. Таким образом четко определяется структура хромосомы и кариотипирование генома.

Тема 8

Полиплоидия. Цитогенетический анализ полиплоидов

Полиплоидия – это геномная мутация, заключающаяся в увеличении числа хромосом, кратного

гаплоидному набору. **Полиплоиды** – это эуплоиды, у которых соматические клетки имеют множественный набор основных хромосом, больший, чем диплоидное число.

Полиплоидные растения могут возникать за счет удвоения генома одного вида – автополиплоид или автополиплоидия (auto – одинаковый) или за счет комбинирования геномов двух или более неродственных видов, аллополиплоид или аллополиплоидия (allo – различный).

Если аллополиплоид произошел от комбинирования хромосом двух различных диплоидных видов, он называется аллотетраплоид или **амфидиплоид**.

Полиплоидные формы отличаются от своих диплоидных прародителей большей относительной мощностью: имеют более крупные листья, цветки, семена, более мощные и грубые стебли. Полиплоидные клетки и их ядра также крупнее.

Если в результате геномной мутации все клетки зародыша оказываются полиплоидными, то из него развивается целый полиплоидный организм, а если только часть клеток организма является полиплоидной, то такой организм называется **химерным**.

Полиплоиды в большинстве случаев имеют большую силу роста и урожайность. Полиплоиды с нечетным числом хромосом – триплоиды или пентаплоиды – в большинстве случаев бесплодны и могут быть использованы в дальнейшем для улучшения культуры по числу хромосом. Ряд агрокультур про-

изошли как естественные полиплоиды. Примерно 70% диких видов семейства злаковых и 23% бобовых – полиплоиды. Большинство естественных полиплоидов являются аллополиплоидами.

У некоторых видов высших растений гаплоидное и диплоидное число хромосом возрастает в арифметической прогрессии. **Геном** – это основной моноплоидный набор хромосом вида (или группы родственных видов), он содержит только один вид каждой хромосомы. Моноплоидное или основное число хромосом вида обозначается символом x . Гаплоидное или гаметное число хромосом вида обозначается символом n , а диплоидное или соматическое число хромосом – $2n$. Для описания хромосомных чисел вида используют следующие термины:

Моноплоид (основное число хромосом)

Гаплоид (гаметное число хромосом)

Диплоидное (соматическое) число хромосом.

Например, у кукурузы, основное и гаплоидное число - 10,

Диплоидное и соматическое число - 20.

Гаплоидное число записывается: $n = x = 10$,

Диплоидное или соматическое число:

$$2n = 2x = 20.$$

У мягкой пшеницы основное число 7,

Гаплоидное число – 21,

Соматическое – 42,

Все записывается следующим образом:

$$2n = 6x = 42.$$

Автополиплоиды и аллополиплоиды могут возникать как путем эндомитоза, так и в результате образования нередуцированных гамет, когда число хромосом не уменьшается вдвое в процессе мейоза, и гаметы содержат соматическое число хромосом. Могут возникать мужские или женские нередуцированные гаметы, и их взаимодействие возможно следующим образом:

- $(2n + n)$ – женские гаметы нередуцированы, мужские редуцированы;

- $(n + 2n)$ – женские гаметы редуцированы, мужские нередуцированы;

- $(2n + 2n)$ – обе гаметы – мужские и женские – нередуцированы.

АЛЛОПОЛИПЛОИДЫ.

Все отдаленные скрещивания делятся на две основные группы:

1. Конгруэнтные - родительские формы, несмотря на различие в генах, имеют «соответствующие» хромосомы, которые могут конъюгировать, не снижая жизнеспособности и фертильности гибридов;

2. Инконгруэнтные - родительские формы имеют «несоответствующие» хромосомы или их разное число, в результате чего у гибридов возникают нарушения в мейозе.

Мейоз у гаплоидов. Гаплоиды – организмы с половинным набором генов, однако этого бывает достаточно для реализации полных событий мейоза. Несмотря на то, что мейоз у гаплоидов происходит,

тем не менее, он имеет свои отклонения. В метафазе I из-за отсутствия партнеров в большинстве клеток образуются только униваленты, иногда могут встречаться биваленты, но только открытого типа. Как следствие неполноценного синапсиса в метафазе I, в анафазе I хромосомы неравномерно расходятся к полюсам. Чаще всего AI у гаплоидов представляет собой вереницу делящихся на хроматиды хромосомы с отстающими или убежавшими к полюсам хромосомами, образуются мосты.

Анеуплоиды – организмы с неполным набором хромосом, т.е. неравным типичному для данного вида. Неправильное расхождение хромосом является следствием анеуплоидии.

Анеуплоидия чаще встречается вследствие неправильного расхождения хромосом при митозе или мейозе под воздействием какого-либо фактора или условий среды.

Растения, имеющие больше или меньше, чем $2n$ хромосом, называются **полисомиками**, число хромосом у них описывается формулой $2n \pm K$, где K – число утраченных или приобретенных хромосом. В зависимости от того, какое число хромосом отсутствует или превышает число хромосом в диплоидном наборе.

Тема 9

Частная цитогенетика пшеницы

С конца 1930-х до середины 1970-х гг. формирование генетической коллекции пшеницы связано с бурным развитием цитогенетических методов. Основой для становления этих методов послужили исследования известного американского ученого Э. Сирса. Используя толерантность мягкой пшеницы к потере или добавлению отдельных хромосом, на основе генотипа сорта Chinese Spring было получено большое разнообразие генотипов по составу и числу хромосом, заложены анеуплоидные линии: полные серии моносомиков, трисомиков, тетрасомиков, нулли-тетрасомиков, дителосомиков, нуллисомиков. Удалось достичь значительного прогресса в понимании сложной аллогексаплоидной природы мягкой пшеницы (вид *T. aestivum* L., геномная формула *AABBDD*) и гомеологии ее хромосом, показать, что у этой пшеницы конъюгация хромосом в мейозе находится под генетическим контролем и происходит так же, как у диплоидных организмов. В практику генетического анализа широко введены новые методы локализации генов в хромосомах – моносомный и нуллисомный анализы, метод картирования генов по отношению к центromере с использованием линий, содержащих телосомические хромосомы. Замечательным

результатом работ Э. Сирса было то, что с использованием созданных и поддерживаемых в живом состоянии анеуплоидов можно было получать аналогичные и новые типы анеуплоидов на других сортах и видах. В табл. 2. перечислены наиболее известные для мягкой пшеницы типы анеуплоидов, которые сохраняются в виде линий.

Таблица. Типы анеуплоидов мягкой пшеницы по Жорра, 1987

№ п.п.	Название	Конфигурация хромосом в метафазе I мейоза
1	Нуллисомики	20"
2	моносомики	20"+1
3	дисомики	21"
4	трисомики	20"+1"
5	тетрасомики	20"+1 ^{IV}
6	нулли-тетрасомики	19"+1 ^{IV}
7	монотелосомики	20"+t
8	дителосомики	20"+t"
9	монотелодисомики	20"+1t"
10	двойные монотелосомики	20"+t+t
11	двойные дителосомики	20"+t"+t"
12	димонотелосомики	20"+t"+t
13	моносомные дополнения	21"+1
14	дисомные дополнения	21"+1"
15	моно-пшеничные и моно-чужеродные замещения	20"+1 +1
16	ди-чужеродные замещения	20"+1"

К середине 1970-х гг. коллекция анеуплоидов насчитывала полторы-две тысячи линий. Позднее были опубликованы сообщения о создании в различных странах мира полных серий моносомных линий на 70 сортах мягкой пшеницы, в том числе на 11 сортах в России, большого числа линий с транслокациями, линий с межсортовым и чужеродным замещением и дополнением хромосом. Созданы гомозиготные фертильные линии, содержащие делеции в каждой из 21-ой пар хромосом. Они оказались пригодными для физического картирования хромосом пшеницы. Для генетического анализа тетраплоидных пшениц получены полные наборы первичных трисомиков (на сорте Cappelli), D-геномных дисомических замещений и двойных дителосомиков (на сорте Langdon). К этим типам анеуплоидных линий адаптированы методы локализации генов, получения транслокаций и замещений, известные для мягкой пшеницы. Анеуплоидные линии пшеницы, линии с межсортовым замещением хромосом, а также гомозиготные рекомбинантные линии по генам одной хромосомы, получаемые от скрещивания линий с межсортовым замещением хромосом с родительским рекуррентным сортом, широко использовались в изучении генетики пшеницы, в том числе в анализе генетического контроля важных для селекции количественных признаков.

Таким образом, цитогенетические методы выявили огромные потенциальные возможности изменчивости кариома пшеницы по числу и составу хромосом и обогатили генетическую коллекцию большим числом линий. Благодаря легкости манипулирования хромосомами пшеница стала моделью для изучения цитогенетики аллополиплоидов. Следует отметить, что за последние годы предпринимались попытки найти международные фонды и объединить усилия ученых Европейских стран в деле сохранения созданных цитогенетических линий пшеницы.

С начала 1970-х гг. в генетическом анализе пшеницы появился целый ряд новых методов и классов изученных ими признаков, коренным образом изменилась ситуация по поиску генетических маркеров, построению генетических и физических карт хромосом.

Так в цитогенетике дальнейшее развитие получили исследования хромосом с помощью методов С- и N-дифференциального окрашивания хроматина. Для описания хромосом стали применяться не только традиционные показатели, такие как размер хромосомы, соотношение плеч, наличие вторичных перетяжек, но и новые – положение, размер и интенсивность окраски гетерохроматиновых районов. Появилась возможность точнее идентифицировать каждую из 21 пары хромосом мягкой пшеницы, выявлять в них в

сравнении с принятым стандартом различия по характеру распределения гетерохроматиновых полос, наличию хромосомных aberrаций. Почти одновременно с этими методами были введены скоростные и высокочувствительные методы анализа множественных молекулярных форм белков, такие как электрофорез и изоэлектрофокусирование. В сочетании с гибридологическим анализом и методами анеуплоидии они позволили охарактеризовать 64 белковые системы, идентифицировать и локализовать 219 генов, контролирующих эти белки. В 1980-е гг. в генетический анализ введен комплекс методов исследования полиморфизма ДНК. Благодаря появлению ДНК-маркеров претерпела изменение техника работы с анеуплоидами: стали возможными ускоренное получение линий, более точная передача хромосом, их плеч, выявление хромосомных aberrаций, но самое главное построение насыщенных генетических карт хромосом. Для пшеницы с использованием различных типов ДНК-маркеров построены молекулярные карты хромосом. По меньшей мере, картировано 800 RFLP-маркеров и 600 микросателлитов. Созданы наборы детально охарактеризованных в молекулярном отношении рекомбинантных инбредных линий. Следует отметить, что построение насыщенных генетических карт хромосом мягкой пшеницы осуществляется более медленными темпами, чем диплоидных видов,

например, вида *Ae. tauschii* Eig – наиболее вероятного донора пшеничного *D* генома или пшеницы однозернянки *T. monococcum* L. (геном *A*)]. Обусловлено это более низким уровнем молекулярного полиморфизма мягкой пшеницы. В настоящее время ДНК-маркеры широко используют для выявления, картирования, клонирования и переноса QTL (Quantitative Trait Loci), отвечающих за проявление селекционноценных признаков.

Анеуплоидная серия пшеницы. В практику генетического анализа широко введены новые методы локализации генов в хромосомах — моносомный и нуллисомный анализы, метод картирования генов по отношению к центромере с использованием линий, содержащих телосомические хромосомы. Замечательным результатом работ Э. Сирса было то, что с использованием созданных и поддерживаемых в живом состоянии анеуплоидов можно было получать аналогичные и новые типы анеуплоидов на других сортах и видах. К середине 1970-х гг. коллекция анеуплоидов насчитывала полторы-две тысячи линий. Позднее были опубликованы сообщения о создании в различных странах мира полных серий моносомных линий на 70 сортах мягкой пшеницы, в том числе на 11 сортах в России, большого числа линий с транслокациями, линий с межсортовым и чужеродным замещением и дополнением хромосом.

Генетическая система контроля конъюгации хромосом у пшеницы (Лекция 6). В 1958 году Е.

Сирс и О. Окамото (США) и независимо от них Р. Райли и В. Чампан (Англия) обнаружили существование гена Ph (pairing homologous), контролирующего конъюгацию гомологичных хромосом в пшенице на хромосоме 5В^L. Механизмы действия гена ph. Первые гипотезы, объясняющие механизм действия гена Ph, появились в конце 60-х годов XX века. Гипотеза Р. Райли с соавторами, названная ими «временной гипотезой» - процесс конъюгации гомологичных хромосом делится на две стадии: притяжения и отталкивания, а хромосома 5В влияет на продолжительность этих стадий. Гены влияющие на конъюгацию хромосом: Главные (мажорные супрессоры конъюгации хромосом) – затрагивают многие стадии конъюгации хромосом и процессы связанные с ними. Второстепенные (минорные супрессоры конъюгации) – затрагивают отдельные стадии и процессы конъюгации хромосом.

Тема 10

Частная цитогенетика кукурузы. Основные методы анализа

Кукуруза очень удобна для генетических исследований:

1. Растение легко выращивается.

2. Приспособлено к широкому спектру природных условий.

3. Имеет большое число четких наследственных изменений. Инбридинг и скрещивания просты и быстры.

4. В результате опыления в початке можно получить сотни зерен. При расщеплении по признакам эндосперма каждое зерно представляет собой отличный индивид.

5. Сравнительно небольшое число относительно больших хромосом облегчает цитологические исследования. Может быть измерена скорость мутаций специфических генов. При исследовании кукурузы были установлены или подтверждены многие основные генетические принципы.

Родс указал, что десять хромосом кукурузы, составляющие ее гаплоидный набор, морфологически различаются: относительной длиной, характерным хромомерным рисунком, наличием и расположением сильно окрашивающихся вздутий; положением центромеры (определяющих соотношение плеч); степенью гетеропикноза хромомер, прилегающих к центромере.

Основная характеристика пахитенного анализа хромосом у кукурузы, в том, что они стабильны у всех видов. Однако, Мак Клинтон исследовала популяцию кукурузы из Южной Америки и пришла к выводу, что длина хромосом и расположение центромер варьирует довольно сильно. При использовании

техник различных окрасок было установлено, что нет сильного варьирования, но имеется полиморфизм по длине хромосом.

Под полиморфизмом имеется ввиду кариотип кукурузы, полиморфизм по гетерохроматиновым узелкам, аномальной 10 хромосомы и добавочным хромосомам.

Тема 11

Частная цитогенетика люцерны

Микроспорогенез у люцерны был впервые описан Reeves в 1930 году, затем описали микро- и макроспорогенез другие авторы. С этого момента началось изучение люцерны. Нормально спорогенез проходит в несколько последовательных этапов. Число спорогенных клеток развивается на ранних этапах в пыльнике, затем идет развитие материнской клетки (МКП). - Pollen mother cells (PMC). Анализ мейоза. Пахитенный анализ хромосом люцерны возможен на диплоидном уровне.

Явление $2n$ гамет. Культура интересна для цитогенетических исследований, поскольку имеет полиплоидный ряд, является автополиплоидом.

У этой культуры было детально изучено и описано явление двух гамет. Явление не столь ново для растений, впервые было описано у дурмана, затем у кукурузы, картофеля. У люцерны Мак Кой описал

его в 1982 году. Нередуцированные гаметы - $2n$ гаметы, участвующие в образовании полиплоидов, отвечают за перенос генов между формами с разным уровнем плоидности. Генный обмен осуществляется как на диплоидном, так и на полиплоидном уровне, вследствие чего $2n$ гаметы формируются у видов, которые не имеют полиплоидного цитотипа и для которых, возможно, характерен в диплоидно-полиплоидно-гаплоидный цикл.

Тема 12

Методы визуализации изображения

Научная иллюстрация — один из самых старых и действенных методов популяризации науки, а благодаря развитию технического прогресса у нее появились неведомые ранее фантастические возможности.

В зависимости от целей цитогенетического исследования используются различные методы окрашивания хромосом. Наиболее распространенными из них являются рутинная или обычная окраска и ряд методов дифференциального окрашивания хромосом: Q-, G-, C-, R- и NOR- или Ag-окраска. В свою очередь методы дифференциального окрашивания делятся на две группы:

1) приводящие к образованию сегментов вдоль длины всех хромосом (например Q-, G- или R-сегменты);

2) приводящие к окрашиванию специфических хромосомных структур, в результате чего выявляется ограниченное число сегментов (C-, T- или NOR-сегменты).

Для обозначения вида окраски используется система трехбуквенного обозначения, включающая основной метод окраски, вариант предварительной обработки препарата хромосом и название красителя (GTG, RHG, QFQ и т.д.). Структуры, выявляющиеся по длине хромосом в соответствии с типом окраски называют Q-, G-, C-, R-сегментами (bands).

Рутинная окраска хромосом достигается путем простого окрашивания полученных хромосомных препаратов красителем Романовского-Гимза (азур-эозином), без какой либо предварительной обработки. Такая окраска приводит к сплошному прокрашиванию хромосом по длине, что не позволяет идентифицировать разные морфологически сходные хромосомы. Рутинная окраска была самой первой используемой в цитогенетике человека окраской, активно применяющейся в течение 1959–1970 гг., до внедрения методов дифференциального окрашивания хромосом. В настоящее время она практически не применяется для диагностики конституциональных хромосомных нарушений, однако находит применение

при анализе хромосомных aberrаций в тестировании факторов среды на мутагенную активность.

Q-окраска (от англ. Quinacrine – акрихин) выявляется на хромосомах в виде чередования ярко- и темнофлюоресцирующих полос с помощью флуоресцентной микроскопии хромосомных препаратов, окрашенных такими флюорохромами (флуоресцентными красителями) как производные акридина – акрихин дигидрохлорид (атебрин) или акрихин-иприт. Эти красители обладают способностью присоединяться к ДНК путем интеркаляции или с помощью внешних ионных сил. Q-окраска имеет свою кодировку (QFQ) по международной цитогенетической номенклатуре. Заслуга применения производных акрихина для получения Q-сегментов на хромосомах человека принадлежит шведскому цитогенетику Касперсону (1970). В популяциях человека существует межиндивидуальная вариабельность отдельных участков хромосом, выявляемых с помощью Q-окраски – Q-полиморфизм хромосом. Он выражается в особенно ярко светящихся сегментах, локализованных в центромерных участках хромосом 3 и 4, а также в коротких плечах и спутниках всех акроцентрических хромосом человека 13–15, 21 и 22. кроме того, у лиц мужского пола ярко флюоресцирующей областью является и дистальная часть длинного плеча хромосомы Y – сегмент q12. Этот участок Y-хромосомы обладает выраженным межиндивидуальным полиморфизмом и четко наследуется по муж-

ской линии. Все перечисленные ярко флюоресцирующие участки хромосом являются областями локализации гетерохроматина – некодирующихся повторяющихся последовательностей ДНК, варибельность которых не приводит к каким-либо фенотипическим изменениям. Указанные выше ярко флюоресцирующие Q-полиморфные хромосомные сегменты являются удобными цитогенетическими маркерами и могут быть использованы как для характеристики популяций, индивидов и клеточных линий, так и для решения некоторых судебно-медицинских проблем.

G-окраска (от англ. Giemsa – Гимза) выявляется благодаря предварительной обработке хромосомных препаратов слабым раствором протеолитического фермента трипсина и последующей окраске красителем Гимза. При этом наблюдается полосатая исчерченность хромосом, где темные полосы в некоторой степени соответствуют гетерохроматиновым районам, а светлые – эухроматиновым. G-окраска имеет свою кодировку (GTG) по международной цитогенетической номенклатуре. Оптимальные условия окраски находят в каждой лаборатории эмпирическим путем. Методика G-окраски хромосом человека была впервые предложена английской исследовательницей Мариной Сибрайт (Seabright) в 1972 году и практически в неизменном виде используется до настоящего времени. По числу, величине и расположению выявляющихся сегментов рисунок G-окраски аналогичен рисунку при Q-окраске, где

темно окрашенные G-сегменты соответствуют флюоресцирующим Q-сегментам. Различия состоят в том, что:

а) несветящиеся гетерохроматиновые центромерные сегменты в хромосомах 1 и 16 хорошо прокрашиваются красителем Гимза;

б) ярко флюоресцирующие при Q-окраске сегменты 3, 4, 13 – 15, 21, 22 и Y-хромосом не выделяются особой интенсивностью при G-окраске. На G-окрашенных метафазных хромосомах выделяется около 320 сегментов на гаплоидный геном.

R-окраска (от англ. Reverse – обратная) отличается противоположностью рисунка G-окраске. Темноокрашенными здесь являются эухроматиновые участки хромосом, а светлыми – гетерохроматиновые. Существует несколько модификаций метода R-окраски и каждый из них имеет кодировку по международной цитогенетической номенклатуре. Наиболее приемлемой является обработка препаратов $Ba(OH)_2$ с прогреванием их при $60\text{ }^\circ\text{C}$ и последующей отмывкой в дистиллированной воде и окрашиванием раствором красителя Гимза. Кодировка R-окраски, полученной таким способом – RHG.

C-окраска (от англ. Constitutive heterohromatin – конститутивный гетерохроматин) выявляется в виде переменных по величине темноокрашенных сегментов конститутивного гетерохроматина в прицентромерных районах хромосом, в то время как эу-

хроматиновые участки хромосом прокрашиваются очень бледно. Методы получения С-окраски могут варьировать, но важным условием является предварительная обработка препаратов щелочью с последующей двухчасовой инкубацией препарата в двукратном стандартном солевом растворе (2?SSC) при 65 °С. В качестве щелочных растворов обычно применяют гидрат окиси бария или натрия. Окраску препаратов производят красителем Гимза. С-окраска имеет свою кодировку (GBG) по международной цитогенетической номенклатуре. Конститутивный гетерохроматин построен преимущественно из многократно повторяющихся последовательностей ДНК, так называемой сателлитной ДНК, выявляемой во время градиентного центрифугирования хроматина. В популяциях человека, также как и в случае Q-окрашивания, существует межиндивидуальная вариабельность по определенным участкам хромосом, в данном случае по величине блоков С-гетерохроматина, выявляемых с помощью С-окраски (С-полиморфизм хромосом). По локализации выделяют 4 типа С-хроматина:

- 1) собственно центромерный, присущий всем хромосомам, с относительно небольшими по площади темноокрашенными блоками;

- 2) более крупные блоки гетерохроматина, располагающиеся в прицентромерных районах длинных плечей аутосом 1, 9 и 16, обладающие четко выраженным межиндивидуальным полиморфизмом;

3) большой блок гетерохроматина дистальной части длинного плеча Y-хромосомы, заметно варьирующий по величине у разных лиц мужского пола;

4) гетерохроматин коротких плеч акроцентрических хромосом.

Метод выявления центромерного гетерохроматина позволяет прежде всего оценить хромосомный полиморфизм четырех хромосом набора – 1, 9, 16 и Y, а также используется в практике клинической цитогенетики для уточнения характера структурных перестроек, затрагивающих данные хромосомы. По международной цитогенетической номенклатуре увеличенные или уменьшенные блоки гетерохроматина обозначаются как qh⁺ или qh⁻ (h – гетерохроматин). Например, запись кариотипа 46,XX,9qh⁺ означает, что у нормальной женщины имеется вариант хромосомы 9 с большим гетерохроматиновым блоком в длинном плече, а запись 46,XYqh⁻ означает, что у мужчины имеется уменьшение длины гетерохроматинового блока на длинном плече хромосомы.

NOR-окраска (от англ. Nucleolar Organizer Region – Ядрышко-Образующие Районы – ЯОР) или Ag-окраска (серебрение) – применяется для выявления ядрышкообразующих районов, расположенных в коротких плечах (сегмент q12 – спутничная нить) всех 5 пар акроцентрических хромосом человека (13, 14, 15, 21 и 22), с помощью окрашивания солями серебра. Известно, что районы ядрышковых организа-

торов содержат гены рибосомальной РНК (рРНК). Ряды рРНК транскрипционных единиц располагаются тандемно вдоль ДНК и отделяются друг от друга нетранскрибируемыми последовательностями – спейсерами. Транскрибируемый район и нетранскрибируемый спейсер тандемно повторяются примерно 40 раз в каждой из 5 пар акроцентрических хромосом, составляя около 400 копий рибосомных генов на геном. В настоящее время для визуализации этих районов на метафазных хромосомах применяют метод серебрения Хоуэлла и Блэка, основанный на использовании комбинации 50 % раствора нитрата серебра с желатиновым проявителем окраски в условиях прогревания препаратов при 60 °С. С помощью этого метода сами хромосомы окрашиваются в желтый цвет, а в коротких плечах акроцентрических хромосом на спутничных нитях четко выделяются черные точечные образования – глыбки восстановленного металлического серебра. Размеры этих глыбок, отражающие активность ЯОР, на разных хромосомах существенно варьируют – от отсутствия заметной окраски, до достаточно крупных блоков серебра (Ag-полиморфизм). Тонкие механизмы окраски ядрышкообразующих районов хромосом пока неизвестны, но ясно, что красящим субстратом является не ДНК рибосомных генов и не рРНК, а кислые белки, связанные с ней. Для оценки данного типа хромосомного полиморфизма предложена полуколичественная 5-балльная система оценки актив-

ности ЯОР каждой из 5 пар акроцентрических хромосом генома человека (0 – отсутствие окраски, 1 – слабая, 2 – средняя, 3 – сильная, 4 – очень сильная окраска ЯОР хромосом, при которой размеры Ag-блока значительно превышают толщину хроматид). При сложении баллов отдельных ЯОР может быть оценена активность всех 10 ЯОР генома по критерию суммарной функциональной активности ЯОР. В популяциях человека существует межиндивидуальный полиморфизм Ag-окрашенных хромосом, который выражается в специфичности степени окраски отдельных хромосом у разных индивидов, являющейся наследуемой характеристикой.

Основная литература:

1. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. Н-Л, 2015 г.- 720с.
2. Цаценко, Л.В. Цитология / Л.В. Цаценко, Ю.С.Бойко. Ростов-на-Дону, Феникс, 2010. – 123с.
3. Цаценко, Л.В. Пыльцевой анализ сельскохозяйственных растений. Методическое пособие / Л.В. Цаценко, А.С. Синельникова, С.Н. Нековаль. Краснодар, КубГАУ, 2012. – 54с.
4. Цаценко, Л. В. Пыльцевой анализ сельскохозяйственных растений: цитологический словарь с иллюстрациями // Л.В. Цаценко, Ю. С. Андреева, А.С. Синельникова – Краснодар: Кубанский ГАУ, 2012. – 67 с.

Дополнительная литература:

1. Смирнов В.Г. Цитогенетика. – М.: Высшая школа, 1991.
2. Пухальский, В.А., Цитология и цитогенетика растений / В.А. Пухальский, А.А. Соловьев, В.Н. Юрцев. М.: изд-во МСХА, 2004. – 278 с.
3. Абрамова, А.И. Цитология растений / А.И. Абрамова, Е.И. Устинова. М., Колос, 1980.
4. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. М., Колос, 1981.
 1. Ригер Р. Генетический и цитогенетический словарь / Р.Ригер, А. Михаэлис. М.Мир, 1967.
 2. Босток К. Хромосома эукариотической клетки / К. Босток. М., Мир, 1981.
 3. Макаров, В.Б. Цитогенетические методы анализа хромосом / В.Б. Макаров, В.В. Сафронов. – М., Наука, 1978. Генетика, биохимия и цитология мейоза. М., Наука, 1982.
 4. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев. Изд-во Новосиб. ун-та, 2002.
 5. Элиот Ф. Селекция растений и цитогенетика / Ф. Элиот. М. Колос. 1961.

Электронно-библиотечные системы библиотеки, используемые в Кубанском ГАУ

№	Наименование ресурса	Тематика	Уровень доступа
---	----------------------	----------	-----------------

1	РГБ	Авторефераты и диссертации	Доступ с компьютеров библиотеки(9 лицензий)
2	Рукопт + Рокстехагро	Универсальная	Доступ с ПК университета
3	Издательство «Лань»	Ветеринария Сельское хозяйство Технология хранения и переработки пищевых продуктов	Доступ с ПК университета
4	IPRbook	Универсальная	Интернет доступ
5	Гарант	Правовая система	Доступ с ПК университета
6	ВИНИТИ РАН	Сельское хозяйство	Доступ с ПК библиотеки
7	Образовательный портал КубГАУ	Универсальная	Доступ с ПК университета
8	Электронный Каталог библиотеки КубГАУ	Универсальная	Доступ с ПК библиотеки
9	СПС КонсультантПлюс	Правовая система	Доступ с ПК университета