

МОРФОЛОГИЯ И ОНТОГЕНЕЗ ЖИВОТНЫХ

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУСКУСНОЙ УТКИ (*CAIRINA MOSCHATA* L.).

П.М. Кленовицкий^{1,2}, Л.А. Волкова¹, Н.А. Волкова¹,
П.В. Ларионова¹, Н.А. Зиновьева¹,
А.А. Никишов²

¹Центр биотехнологии и молекулярной диагностики
ФГБНУ Всероссийский НИИ животноводства
п. Дубровицы, Подольский р-н, МО, 142132

²Департамент ветеринарной медицины
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

Приведена методика получения и анализа хромосомных препаратов у птицы. Описан кариотип *Cairina moschata* L. Дана денситометрическая характеристика метацентрических макрохромосом мускусной утки.

Ключевые слова: денситограмма, кариотип, мускусная утка, хромосомы.

К настоящему времени достигнуты значительные успехи в изучении наследственного аппарата основных видов культурных и диких форм животных. Детально описаны не только их кариотипы в норме, но и различные варианты хромосомной патологии и их влияние на продуктивность животных [1—4]. В меньшей степени эти вопросы изучены у птицы [5; 6].

Значительную роль цитогенетические исследования играют в решении вопросов филогенеза в классах *Mammalia* и *Avis* [2; 3; 7—11], а также проблем селекции и экспериментальной генетики [12].

В силу высокой репродуктивной способности и относительно высокой скорости смены поколений домашняя птица является удобной моделью для решения многих вопросов прикладной и экспериментальной генетики, в том числе связанных с проблемами генетической трансформации у животных.

Из птиц наиболее полно изучен кариотип *Gallus domesticus* L. [13—15]. Достаточно детально исследован кариотип гусей (*Anser anser*) [16—19]. Авторы отмечают, что в популяциях гусей из разных регионов мира наблюдается полиморфизм по 2, 3 и 4 парам хромосом. Данные по цитогенетике *Cairina moschata* L ограничены [20].

Необходимо отметить, что в большинстве работ кариотипы птицы получены на основе исследования клеток костного мозга или эмбрионального материала. Последний подход нашел применение при изучении хромосомной локализации генетических маркеров [21]. Однако для исследований по экспериментальной генетике наибольший интерес представляет прижизненное изучение состояния хромосомного аппарата. Поэтому мы поставили задачу провести адаптацию методов получения препаратов хромосом из культуры крови применительно к мускусной утке.

Материал и методы. Исследования выполнены в Центре биотехнологии и молекулярной диагностики ВИЖ им. Л.К. Эрнста на 5 самках мускусной утки. Препараты хромосом готовили из культуры лимфоцитов периферической крови по методике, предложенной нами ранее [4]. В качестве митогена использовали конакавалин А (КоА) в дозе 10 мкг/мл. На рис. 1 показан общий вид культуры периферической крови *C. moschata*, стимулированной КоА.

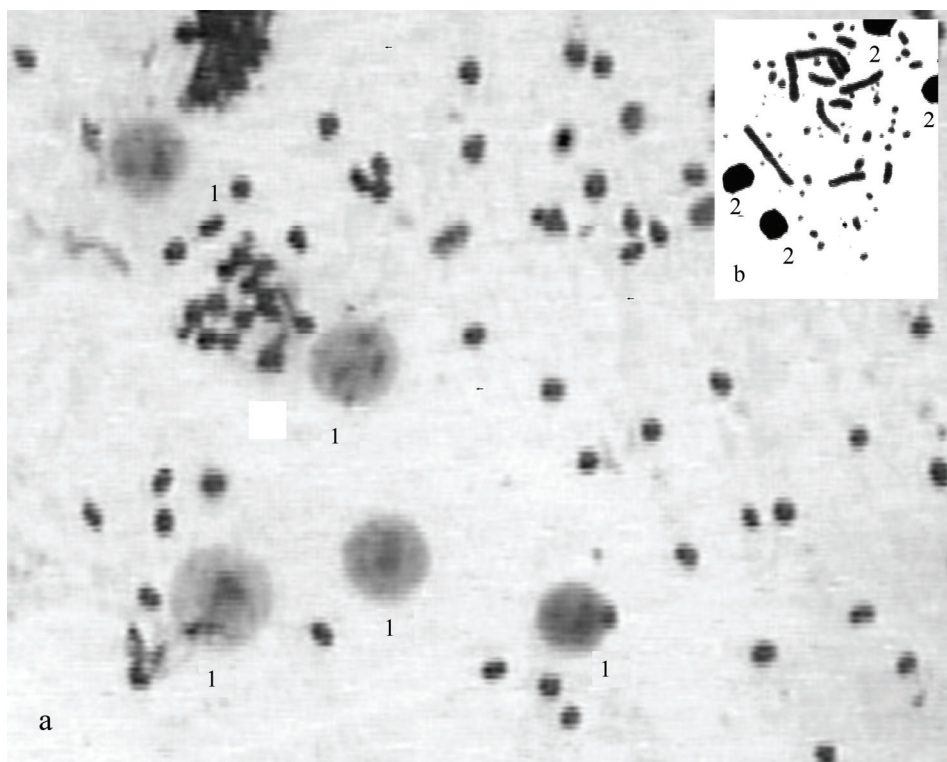


Рис. 1. Культура периферической крови *C. moschata*, стимулированная КоА:

а) общий вид; б) метафаза; 1) лимфоциты; 2) ядра эритроцитов

Денситометрические профили определяли для первых двух пар макрохромосом с помощью программы Image Score 1. Для построения обобщенного (усредненного) профиля мы проводили нормировку индивидуальных профилей по длине. В основу нормировки оптических профилей были положены принципы, описанные в работе А.Ф. Яковлева с соавт. [22].

Завершая описание методической стороны данного вопроса, необходимо обратить внимание на следующие методические моменты. Во-первых, кривизна отбираемых для анализа хромосом должна быть минимальна. Во-вторых, поскольку профиль строится на основании усредненных по ширине зоны сканирования данных, хроматиды должны быть максимально сближены. В-третьих, максимальная ширина зоны сканирования составляет 20 пиксел, следовательно, ширина изображения анализируемой хромосомы не должна превышать этой величины. В-четвертых, степень спирализации хромосом должна быть практически одинаковой.

Таблица 1 иллюстрирует принцип нормирования оптических профилей.

Таблица 1

Схема нормирования денситограмм

	A	B	C	D	E	F
1	0	220	0	1,470586	0	220
2	5,81558	193	1,470586	—	1	201,64
3	11,6312	176	2,941172	—	2	186,88
4	17,4467	176	4,411758	—	3	176
5	23,2623	192	5,882345	—	4	176
6	29,0779	201	7,352931	—	5	182,4001
7	34,8935	200	8,823517	—	6	192,7201
8	40,7091	198	10,2941	—	7	198,8401
9	46,5247	194	11,76469	—	8	200,56
10	52,3402	192	13,23528	—	9	—
11	58,1558	195	14,70586	—	10	—
		X	k	s	L	D

Примечание. Фоном выделены ячейки, соответствующие искомому значению плотности и определяющим его аргументам. В нижней строке в выделенных ячейках даны соответствующие столбцам обозначения элементов приведенного ниже уравнения (1).

Программа Image Score 1 сохраняет в CSV-файле, совместимом с Microsoft Excel, информацию об оптической плотности точек, расположенных на стандартном расстоянии друг от друга. Величина шага между точками сканирования зависит от величины хромосомы и увеличения объекта. Для каждой хромосомы с помощью Microsoft Excel вычисляли положение точек сканирования, записанных в CSV-файл, в процентах от длины хромосомы, за исходную точку отсчета (репер) брали центромерный район для акроцентриков и теломеру короткого плеча для метацентриков. Затем рассчитывали плотности для стандартных точек, расположенных с шагом в 1 процент по следующей формуле:

$$D = X_i + (X_i - X_{i-1}) / s (L_i - k_i), \quad (1)$$

где D — искомая оптическая плотность, X_i и X_{i-1} — оптические плотности в точках, фланкирующих искомую стандартную точку, s — расстояние между исходными точками в процентах, L_i — координата искомой точки на стандартной шкале, k_i — координата точки X_i на исходной шкале.

Схематически процесс нормирования оптических плотностей с помощью Microsoft Excel показан в табл. 1.

В данном примере показан расчет оптической плотности для точки, удаленной от репера на расстояние L , равное 8%. В столбце А приведено расстояние между точками сканирования в физических единицах, необходимое для расчета постоянной величины $-s$. Для того чтобы ячейка D1 могла выполнять роль константы, ей с помощью средств Microsoft Excel присваивается соответствующее имя.

При построении оптических профилей необходимо учитывать, что Image Score 1 фиксирует по 255-байтной шкале не плотность, а яркость объекта. При этом зонам с максимальной плотностью соответствуют значения, близкие к 0, в связи с чем для построения оптического профиля необходимо преобразовать полученные цифровые значения, вычитая исходные величины из 255.

Результаты и обсуждение. По литературным данным диплоидное число хромосом *C. moschata* равно 80 [20]. На рис. 2 показаны кариотипы самок мускусной утки, полученных из культуры лимфоцитов периферической крови, стимулированных конакавалином А.

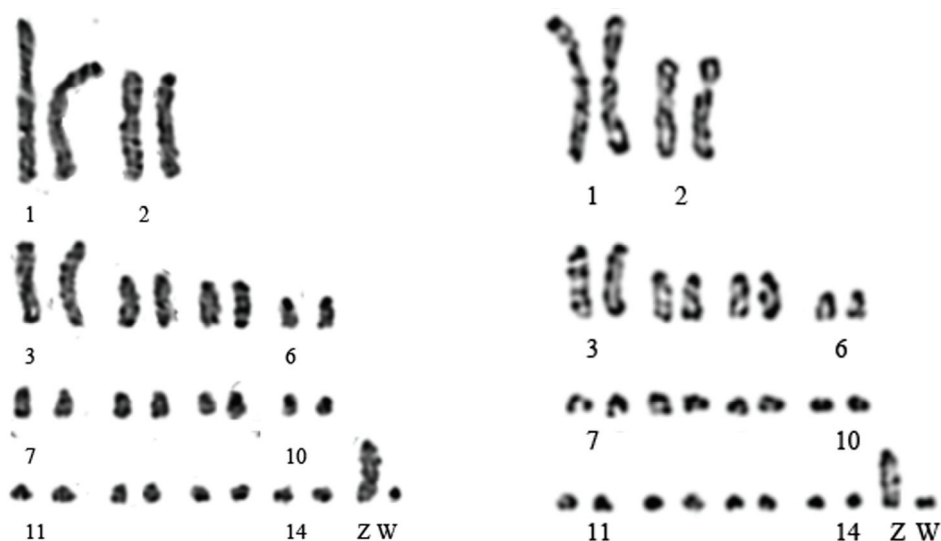


Рис. 2. Кариотипы самок мускусной утки (*C. moschata* L.).

Оформлено с помощью Image Scope 1 и Photoshop 5.5.

В основу построения кариотипа положены общепринятые принципы: расположение хромосом в порядке убывания, начиная с двухплечих, выделение половых хромосом в отдельную группу.

По нашим данным, в кариотипе *C. moschata* L. можно выделить 6 пар макрохромосом (в их числе 2 пары субметацентриков) 8 пар акроцентрических субмикрохромосом и непостоянное число микрохромосом.

Мужская половая хромосома — крупный акроцентрик, по размерам близкий к третьей паре аутосом. Женская половая хромосома — одна из микрохромосом. Точная идентификация ее морфологии на хромосомах средней степени спирализации затруднена. В части метафаз у обследованных птиц четко просматривается продольная неоднородность хромосом. Используя пригодные для денситометрии препараты, мы проанализировали оптические профили первых пар хромосом у курицы и мускусной утки.

Эти данные согласуются с результатами, полученными Wójcik E., Smalec E. [20], согласно которым кариотип мускусной утки содержит 40 пар хромосом, включая три пары макрохромосом, 36 пар микрохромосом и пару половых хромосом. Две первые пары являются крупнейшими субметацентриками, а все остальные аутосомы являются акроцентрическими. Z-хромосома субметацентрическая, W хромосома мелкий элемент набора.

Важным моментом анализа кариотипов является изучение тонкой структуры хромосом. На рис. 3а показан нормированный оптический профиль первой хромосомы мускусной утки. На денситограмме четко идентифицируется 16 зон разной оптической плотности. Минимум оптической плотности приходится на точку с координатой 39, соответствующей центромере. На коротком плече четко идентифицируются три оптически плотных блока. Наиболее крупный из них расположен в прителомерном районе. Анализ денситограммы свидетельствует о его неоднородности. Длинное плечо содержит пять оптически плотных блоков. Два наиболее крупных из них лежат в зоне, ограниченной координатами 65 и 90.

На хромосоме 2 (рис. 3б) можно выделить 17 основных блоков с разной оптической плотностью. Некоторые из них разделяются на более мелкие зоны. Центромере соответствует точка с координатой 41, на которую приходится минимум оптической плотности. На коротком плече четко идентифицируются четыре оптически плотных блока. Наиболее крупный из них расположен, как и на хромосоме 1, в прителомерном районе. Длинное плечо содержит пять оптически плотных блоков. Два из них: первый и третий распадаются на несколько мелких зон.

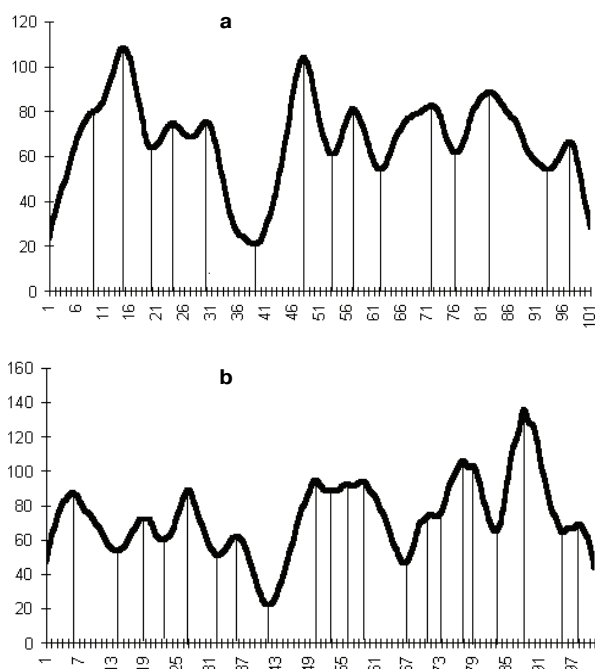


Рис. 3. Оптический профиль хромосом 1 (а) и 2 (б) пар у мускусной утки.

Оформлено с помощью Image Scope 1 и Microsoft Excel

Анализ приведенных данных свидетельствует о том, что для первой хромосомы характерно наличие более крупных блоков, характеризующихся высокой оптической плотностью. Это указывает на различия между анализируемыми хромосомами в степени конденсации генетического материала. Для второй хромосомы типично наличие большего числа деконденсированных зон. Вместе с тем связь между рисунком денситограммы и средней оптической плотностью отсутствует.

Нами не обнаружено достоверных различий по средней оптической плотности как между 1-й и 2-й парами хромосом мускусной утки, так и между гомологами в пределах пар. Нами не обнаружено достоверных различий по средней оптической плотности как между 1-й и 2-й парами хромосом мускусной утки, так и между гомологами в пределах пар (табл. 2).

Таблица 2

Средняя оптическая плотность хромосом мускусной утки

№ хромосомы	№ гомолога		В среднем
	1	2	
1	56,8 ± 5,2	77,8 ± 20,4	67,3 ± 12,8
2	67,6 ± 11,0	78,9 ± 8,4	73,2 ± 9,0

При сравнении денситограмм парных хромосом отмечено высокое совпадение их рисунка, хотя и существуют определенные отличия, обусловленные как разной степенью их плотности, так и неодинаковой конденсацией. Иллюстрацией этому служат данные приведенные на рис. 4.



Рис. 4. Оптические профили гомологичных хромосом 2-й пары мускусной утки.

Оформлено с помощью Image Scope 1 и Microsoft Excel

У мускусной утки нами не обнаружено значительного гетероморфизма по длине гомологов, описанного Л.В. Трофимовой [13; 14] у домашней курицы. Не исключено, что существуют определенные видовые особенности организации макрохромосом у птицы.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности использованных методических подходов в исследованиях по цитогенетике птицы. Результаты наших

исследований позволяют дать морфологическую характеристику макро- и субмикрочромосом мускусной утки. Данные о морфологии и тонкой структуре хромосом *C. moschata* L. представляют интерес при проведении исследований по экспериментальной и прикладной генетике птицы.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Яковлев А.Ф. Цитогенетическая оценка племенных животных. М.: Агропромиздат, 1985.
- [2] Багиров В.А., Кленовицкий П.М., Насибов Ш.Н., Иолчиев Б.С., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Цитогенетический анализ при отдаленной гибридизации полорогих // Достижения науки и техники АПК. 2009. № 8. С. 41—43.
- [3] Графодатский А.С., Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных животных. Атлас. Новосибирск: Наука, 1988.
- [4] Кленовицкий П.М., Багиров В.А., Иолчиев Б.С., Доцев А.В. Вопросы прикладной цитогенетики сельскохозяйственных животных // Достижения науки и техники АПК. 2003. № 10. С. 17.
- [5] Fechheimer N.S., Zartman D.L., Jaap R.G. Trisomic and haploid embryos of the chick (*Gallus domesticus*) // J. Reprod. Fert. 1968. V. 17. P. 215—217.
- [6] Fhamida B. Islam, Satoshi Ishishita, Yoshinobu Uno, Md. Bazlur R. Mollah, Kornorn Srikulnath, and Yoichi Matsuda. Male Hybrid Sterility in the Mule Duck is Associated with Meiotic Arrest in Primary Spermatocytes // J. Poult. Sci. 2013. V. 50. P. 311—320.
- [7] Дзюев Р.И. Хромосомные наборы млекопитающих Кавказа. Нальчик: Эльбрус, 1998.
- [8] Nobuo Takagi, Sajiro Makino A revised study on the chromosomes of three species of birds // Caryologia. 1966. V. 19. N. 4. P. 443—455.
- [9] Hammar B.O. The karyotypes of nine birds // Hereditas. 1966. V. 55. P. 367—385.
- [10] Marcella Mergulhao Tagliarini, Cleusa Yoshico Nagamachi, Julio Cesar Pieczarka, Edivaldo Herculano Correa de Oliveira. Description of two new karyotypes and cytotaxonomic considerations on Falconiformes // Revista Brasileira de Ornitologia. 2007. V. 15. N 2. P. 261—266.
- [11] Ivanete de Oliveira Furo, Rafael Kretschmer, Patricia C. O'Brien, Malcolm A. Ferguson-Smith, Edivaldo Herculano Correa de Oliveira. Chromosomal Diversity and Karyotype Evolution in South American Macaws (Psittaciformes, Psittacidae), 2015.
- [12] Эрнст Л.К., Кленовицкий П.М., Багиров В.А., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А., Гусев И.В., Данч С.С., Брем Г. Состояние хромосомного аппарата у свиней, трансгенных по гену соматолиберина человека mT1/RHGH // Сельскохозяйственная биология. 2009. № 2. С. 31—36.
- [13] Трофимова Л.В. Репликация ДНК по длине макрохромосом кур во второй половине S-периода // Бюллетень ВНИИРГЖ. Л., 1977. В. 24. С. 6—9.
- [14] Трофимова Л.В. Морфофункциональная характеристика хромосом домашних кур *Gallus domesticus*: Автореф. дисс. ... канд. наук. Л., 1979.
- [15] Яковлев А.Ф., Трофимова Л.В. Изменение числа микрохромосом в процессе спирализации макрохромосом у *Gallus domesticus* // Генетика. 1977. Т. 13. № 5. С. 806—810.
- [16] Shahin A.A., Ata A.T., Shnaf A.S. Karyotype and C-banding pattern of the domestic geese *Anser anser* populations (Aves: Anatidae) in Egypt // Folia Biol. Krakow. 2014. V. 62. N 1. P. 49—58.
- [17] Wójcik E., Smalec E. Assessment of chromosome instability in geese (*Anser anser*) // Can. J. Anim. Sci. 2012. V. 92. P. 49—57.
- [18] Andraszek K., Smalec E., Wrzaszcz Ż. Description of G bands on the chromosomes of the European domestic goose (*Anser anser*) Charakterisierung der G-Bänder auf den Chromosomen der europäischen Hausgans (*Anser anser*) // Arch. Geflügelk. 2007. V. 71. № 6. P. 272—277.

- [19] Wójcik E., Smalec E. Description of the Anser anser goose karyotype // *Folia biol. Kraków*. 2007. N 1—2. V. 55. P. 35—40.
- [20] Wójcik E., Smalec E. Description of the Muscovy Duck (*Cairina moschata*) Karyotype // *Folia Biologica. Kraków*. 2008. V. 56. № 3—4. P. 243—248.
- [21] Сазанов А.А. Молекулярно-генетический анализ генома птиц: Автореф. дисс. ... доктора наук. С.П. 2004.
- [22] Исследование хромосом сельскохозяйственных животных. Методические рекомендации / под ред. А.Ф. Яковлева. Л., 1976. С. 20—30.

CYTOGENETICAL CHARACTERISTIC OF MUSCOVY DUCK (CAIRINA MOSCHATA L.)

**P.M. Klenovitskiy^{1,2}, L.A. Volkova¹, N.A. Volkova¹,
P.V. Larionova¹, N.A. Zinoveva¹, A.A. Nikishov²**

¹All-Russian State Research Institute of Animal Breeding
Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Region, 142132

²Department of Veterinary
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, Russia, 117198

The technique of preparation bird's chromosomes is given. The methodical approaches to reception are stated and analysis chromosomes at birds. Is described karyotype of *Cairina moschata* L. Is given the densitometry characteristic of methacentric macrochromosomes of muscovy duck.

Key words: densitogram, karyotype, muscovy duck chromosomes.

REFERENCES

- [1] Yakovlev A.F. Cytogenetic evaluation of breeding animals. M.: Agropromizdat, 1985.
- [2] Bagirov B.A., Klenovitskii M.P., Nasibov Sh.N., Iolchiev B.S., Zinovyeva N., Ernst L.K. Cytogenetic analysis in distant hybridization of bovinds. *Advances in science and technology AIC*. 2009. No. 8. P. 41—43.
- [3] Graphodatsky A.S., Radjabli S.I. Chromosomes of agricultural and laboratory animals. Atlas. Novosibirsk: Nauka, 1988.
- [4] Klenovitskii P.M., Bagirov V.A., Iolchiev B.S., Diev B.A. Applied cytogenetics of farm animals. *Advances in science and technology AIC*. 2003. № 10. P. 17.
- [5] Fechheimer N.S., Zartman D.L., Jaap R.G. Trisomic and haploid embryos of the chick (*Gallus domesticus*). *J. Reprod. Fert.* 1968. V. 17. P. 215—217.
- [6] Fhamida B. Islam, Satoshi Ishishita, Yoshinobu Uno, Md. Bazlur R. Mollah, Kornsom Srikulnath, and Yoichi Matsuda. Male Hybrid Sterility in the Mule Duck is Associated with Meiotic Arrest in Primary Spermatocytes. *J. Poult. Sci.* 2013. V. 50. P. 311—320.
- [7] Dzuyev R.I. Chromosome sets of mammals of the Caucasus. Nalchik: Elbrus, 1998.
- [8] Nobuo Takagi, Sajiro Makino. A revised study on the chromosomes of three species of birds. *Caryologia*. 1966. V. 19. N. 4. P. 443—455.
- [9] Hammar B.O. The karyotypes of nine birds. *Hereditas*. 1966. V. 55. P. 367—385.

- [10] Marcella Mergulhao Tagliarini, Cleusa Yoshico Nagamachi, Julio Cesar Pieczarka, Edivaldo Herculano Correa de Oliveira. Description of two new karyo-types and cytotoxic considerations on Falconiformes. *Revista Brasileira de Ornitologia*. 2007. V. 15. N 2. P. 261—266.
- [11] Ivanete de Oliveira Furo, Rafael Kretschmer, Patricia C. O'Brien, Malcolm A. Ferguson-Smith, Edivaldo Herculano Correa de Oliveira. Chromosomal Diversity and Karyotype Evolution in South American Macaws (Psittaciformes, Psittacidae). 2015.
- [12] Ernst L.K., Klenovitsky P.M., Bagirov V.A., Volkova N., Zinovyeva N., Gusev I.V., Dan S.S., Brem G. The State of the chromosome apparatus in pigs, transgenic for the gene of somatoliberin human mT1/RHGH. *Agricultural biology*. 2009. No. 2. P. 31—36.
- [13] Trofimova L.V. Replication of DNA along the length of microchromosome chickens in the second half of the S-period. *Bulletin VIERGE*. L., 1977. V. 24. C. 6—9.
- [14] Trofimova L.V. Morphological characteristics of the chromosomes of the domestic chicken *Gallus domesticus*. Abstract of Diss. candidate sciences. L., 1979.
- [15] Yakovlev A.F., Trofimova L.V. The change in the number of microchromosome in the process of helix macrochromosomes in *Gallus domesticus*. *Genetics*. 1977. Vol. 13. No. 5. S. 806—810.
- [16] Shahin A.A., Ata A.T., Shnaf A.S. Karyotype and C-banding pattern of the domestic geese *Anser anser* populations (Aves: Anatidae) in Egypt. *Folia Biol. Krakow*. 2014. V. 62. N 1. P. 49—58.
- [17] Wójcik E., Smalec E. Assessment of chromosome instability in geese (*Anser anser*). *Can. J. Anim. Sci.* 2012. V. 92. P. 49—57.
- [18] Andraszek K., Smalec E., Wrzaszcz Ż. Description of G bands on the chromosomes of the European domestic goose (*Anser anser*) Charakterisierung der G-Bänder auf den Chromosomen der europäischen Hausgans (*Anser anser*). *Arch. Geflügelk.* 2007. V. 71. № 6. P. 272—277.
- [19] Wójcik E., Smalec E. Description of the *Anser anser* goose karyotype. *Folia biol. Kraków*. 2007. N 1—2. V. 55. P. 35—40.
- [20] Wójcik E., Smalec E. Description of the Muscovy Duck (*Cairina moschata*) Karyotype. *Folia Biologica. Kraków*. 2008. V. 56. № 3—4. P. 243—248.
- [21] Sazanov A.A. Molecular genetic analysis of the genome of birds. Abstract of Diss. doctor of Sciences. S.P., 2004.
- [22] The study of chromosomes of farm animals. Methodical recommendations. Ed. A.F. Yakovleva. L., 1976. P. 20—30.