

ANÁLISIS FISH EN *Pisum sativum* Y *P. fulvum* CON SECUENCIA TELOMÉRICA DE ARABIDOPSIS Y RIBOSÓMICA DE SOYA¹

Alfredo Bolaños-Herrera², Adoración Cabrera-Caballero³, Rocío Recio-Castro⁴

RESUMEN

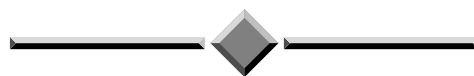
Análisis FISH en *Pisum sativum* y *P. fulvum* con secuencia telomérica de arabidopsis y ribosómica de soya. La secuencia 18/25S rDNA de la soja y la TTTAGGG de *A. thaliana* fueron utilizadas como sondas con el objetivo de analizar la organización de los genomas de *Pisum sativum*, *P. fulvum* y las líneas F₄ (*P. sativum* X *P. fulvum*) con la técnica de la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). El experimento se realizó en la Universidad de Córdoba, España, en el verano del 2006. La sonda 18/25S produjo señales de intensidad variable en las tres líneas. Estas señales corresponden con los pares de organizadores nucleolares (NOR) localizados en los cromosomas 4 y 7 de *P. sativum* y 4, 7 y 5 de *P. fulvum*. La intensidad de las señales varió de muy fuerte a medianamente fuerte en *P. sativum*, a pequeñas y discretas en *P. fulvum*, lo que sugiere que existen diferencias en el número de veces que la secuencia se repite en los genomas de estas dos especies. Las señales que se observaron en la línea F₄ con la sonda de rDNA se asemejaron en tamaño e intensidad a las que se observaron en *P. sativum* y *P. fulvum*. Las muestras de las líneas F₄ evaluadas presentaron dos NOR, si bien en una de ellas se observó una señal muy baja en un tercer par de cromosomas. La secuencia TTTAGGG hibridó en los telómeros de las tres líneas estudiadas, lo que mostró que la secuencia telomérica de *A. thaliana* está también presente en el género *Pisum*.

Palabras clave: Citogenética, *in situ* fluorescente, NOR, 18/25S rDNA, TTTAGGG.

ABSTRACT

FISH analysis in *Pisum sativum* and *P. fulvum* with a telomeric sequence from *Arabidopsis* and a ribosomal one from soybean. The sequence 18/25S rDNA from soybean and the TTTAGGG from *A. thaliana* were used as probes to analyze the genomic organization of *Pisum sativum*, *P. fulvum* and a F₄ line (*P. sativum* X *P. fulvum*) by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). The experiment was conducted at the University of Córdoba, Spain during the summer of 2006. The probe 18/25S produced variable signals in the three genotypes. These rDNA signals correspond to the nucleolar organizing pairs (NOR`s) on chromosomes 4 and 7 of *P. sativum*, and 4, 7 and 5 of *P. fulvum*. The intensity of signals varied from very strong to moderately-strong in *P. sativum* to small and discrete in *P. fulvum*, suggesting clear differences on the number of times that the sequence 18/25S is repeated in the genome of these two species. Signals observed in the F₄ line using the rDNA probe resembled *P. sativum* and *P. fulvum* knobs. Two NOR`s were observed on the F₄ line, although one of the lines showed very low signals for one pair of chromosomes. The TTTAGGG sequence hybridized with the telomeres of the three lines, which shows that the telomeric sequence from *A. thaliana* is also present in the *Pisum* genera.

Key words: Cyto-genetics, fluorescent *in situ* hybridization, NOR, 18/25S rDNA, TTTAGGG.



¹ Recibido: 21 de diciembre, 2007. Aceptado: 19 de marzo, 2009. Parte de la tesis doctoral del primer autor.

² Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), Costa Rica. Sabana Sur, San José, Costa Rica. ab24@cornell.edu

³ Departamento de Genética y Mejora Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes (ETSIAM). Universidad de Córdoba, edificio Gregor J. Mendel Campus de Rabanales, 14071 Córdoba España. ge1cabca@uco.es; rore7@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La hibridación interespecífica es una estrategia para la mejora vegetal, que tiene como objetivo ampliar la base genética de las variedades cultivadas y proporcionar los genes necesarios para reducir o anular el efecto negativo, de las plagas y los componentes abióticos del ambiente, sobre el rendimiento y calidad de las cosechas. La arveja o guisante (*Pisum sativum* L.) ($2n=2x=14$) no escapa a las consideraciones anteriores (Fuchs *et al.* 1998, Tar'an *et al.* 2003, Tar'an *et al.* 2005). Dentro del género *Pisum*, especial interés ha recibido la especie silvestre *P. fulvum* ($2n=2x=14$), en la que se han identificado genes de resistencia a varias plagas (Fondevilla 2005, Hardie *et al.* 1995, Sharma y Yadav 2003). Aún cuando existe cierto nivel de incompatibilidad entre estas dos especies (Ochatt *et al.* 2004) originada posiblemente en diferencias morfológicas entre cromosomas homeólogos o en la distribución de secuencias repetidas en el genoma (Schwarzacher 2003) varios genes de resistencia a plagas han sido introducidos con éxito en *P. sativum* (Fondevilla 2005, Fondevilla *et al.* 2005).

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica robusta que permite identificar cada uno de los cromosomas de una determinada especie (Cerbah *et al.* 1999, Fuchs *et al.* 1998, Samatadze *et al.* 2005, Schneider *et al.* 2003, Vischi *et al.* 2003) distinguir en un individuo la localización y magnitud del aporte cromosómico de cada uno de los progenitores (Samatadze *et al.* 2005, Soliman *et al.* 2001).

La localización por FISH de secuencias repetidas de la familia de genes nrDNA permite localizar los organizadores nucleolares (NOR) ya que algunas secuencias de esta familia de genes hibridan con señales fuertes en estas zonas (Schmidt *et al.* 1994, Fuchs *et al.* 1998, Cerbah *et al.* 1999, Falistocco *et al.* 2002, Prieto *et al.* 2004) y pueden utilizarse como puntos físicos de referencia tanto para la identificación de un brazo de brazos cromosómicos en particular, como para la integración de los mapas de ligamiento con los mapas físicos (Sadler y Weber 2002, Stephens *et al.* 2004).

Las sondas construidas con secuencias repetidas teloméricas (TTTAGGG) son de utilidad para visualizar la estructura de los cromosomas, éstas hibridan al final de los cromosomas únicamente (Fuchs *et al.* 1998, Sykorova *et al.* 2003) aunque esta secuencia no se presenta en todas las plantas (Adams *et al.* 2000) y en algunos casos secuencias teloméricas heterólogas

pueden no hibridar en todos los cromosomas o bien hacerlo con intensidad variable (Pedrosa *et al.* 2002). Las secuencias subteloómicas o asociadas a los telómeros hibridan en otros sitios de los brazos de los cromosomas (Kolchinsky y Gresshoff 1994) con lo que pueden producir patrones válidos para comparar genomas.

En la presente investigación se utilizó la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para comparar la organización de los genomas de *P. sativum* y *P. fulvum* mediante la utilización de sondas correspondientes a secuencias de rDNA de soja y telomérica de *Arabidopsis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en los laboratorios del Departamento de Genética y Mejora Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes (ETSIAM) Universidad de Córdoba, España, durante el verano del 2006.

Material vegetal y preparación de los cromosomas

Como material vegetal se utilizaron secciones de raíces de aproximadamente 1 cm de largo, que se obtuvieron a partir de semillas germinadas en cámara húmeda del cultivar Ballet (*P. sativum*) de *P. fulvum* (línea P660) y de plantas correspondientes al cuarto ciclo de autopolinización (F_4) del híbrido obtenido de la cruce entre Ballet y P660 (amablemente cedidas por el Dr. Diego Rubiales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Córdoba). Las raíces y preparaciones se procesaron según el protocolo utilizado en el laboratorio para raíces de trigo y otras gramíneas (Cabrera *et al.* 2002). Las secciones de raíz se colocaron en solución de colchicina al 0,05% durante tres horas en la oscuridad y luego se colocaron en viales con una solución de etanol:ácido acético 3:1 (v:v) y se guardaron en refrigeración (4 °C) hasta la preparación de las muestras cromosómicas. Para la preparación de las muestras, se sumergió una raíz en carmín acético por uno o dos minutos, tras lo cual se colocó sobre un vidrio porta objetos donde se cortó transversalmente una sección muy fina, la que se humedeció con una gota de ácido acético al 45%. De seguido se cubrió con un vidrio cubre objetos sobre el que se colocó un papel y se aplicó presión con el dedo pulgar. Finalmente se pasó la preparación sobre la llama de un mechero para

luego localizar los cromosomas en un microscopio de fase.

Las preparaciones en las que se encontraron metafases somáticas con buena morfología, se congelaron en nitrógeno líquido, se les removió el cubre objetos y luego de que se secaron a 23 °C y 60 % HR (RT) se guardaron en refrigeración hasta realizar el análisis FISH.

Sondas, preparación y marcaje

La secuencia completa 18/25 rDNA aislada de la soja se marcó con biotina (Roche 1093070) por Nick Translation siguiendo el protocolo del fabricante (Kit de Boehringer 976776). La detección se hizo con rodamina. La secuencia telomérica aislada de *Arabidopsis thaliana* pAtT4 (Richards y Ausbel 1988) se marcó también por Nick Translation con dioxigenina (Roche 1109088910) siguiendo el protocolo del fabricante (Kit de Boehringer 976776). La detección de la sonda se realizó con fluoresceína.

Hibridación *in situ* fluorescente y localización de las sondas en las preparaciones cromosómicas

El análisis FISH se realizó según el protocolo utilizado en el laboratorio para muestras de trigo y otros cereales (Cabrera *et al.* 2002). Las preparaciones se incubaron por dos horas a 37 °C con 50 ul de solución de RNAsa (100 ul 20XSSC, 10 ul RNAsa y 890 ul de agua estéril) cubiertas con un cubre objetos. Seguidamente se lavaron dos veces con solución 2XSSC por cinco minutos a temperatura ambiente (RT) y una vez a 37 °C por cinco minutos. Luego se trataron en una solución al 1% de pepsina (al 5%) y 1% HCl 1M en agua destilada por 10 minutos a 37 °C. A continuación se lavaron dos veces en buffer salino de fosfato (PBS 1X) por cinco minutos a RT. De seguido se trataron con una solución al 1% formaldehído en PBS 10X, 50mM CIMg por 10 minutos a RT. Por último se volvieron a lavar en PBS 1X por cinco minutos a RT. Antes de aplicar las sondas, las preparaciones se deshidrataron con un lavado en etanol al 75% y otro con etanol al 100% por tres minutos cada uno y se dejaron secar a 23 °C y 60 % HR (RT) sobre la mesa del laboratorio.

Una vez secas las preparaciones, cada una se trató con 2 ng/ul de cada sonda disueltas y desnaturalizadas en la mezcla de hibridación, que consistió de una solución al 50% de formamida desionizada y 10% de sulfato de dextrano y 10% de 2XSSC en agua destilada.

Para la desnaturalización de las sondas, la mezcla se calentó a 75 °C durante ocho minutos tras lo cual se colocó en hielo picado por cinco minutos. Las preparaciones se cubrieron con cubre objetos y se procedió a la desnaturalización conjunta de los cromosomas en las preparaciones y las sondas aplicadas. Para ello se colocaron las muestras en un termociclador programado en la siguiente secuencia: siete minutos a 75 °C, dos minutos a 55 °C, 30 segundos a 50 °C, un minuto a 45 °C, dos minutos a 42 °C, cinco minutos a 40 °C y cinco minutos a 38 °C. Seguidamente las preparaciones se encubaron en cámara húmeda a 37 °C por 16 horas.

Tras la incubación, las preparaciones se lavaron dos veces con una solución de 2XSSC a 37 °C por cinco minutos y dos veces más con la misma solución a media concentración (1SSC) por cinco minutos a RT. Seguidamente se trataron con una solución de Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y 0,05% Tween-20 en agua destilada (TNT) por cinco minutos a RT seguida por el tratamiento con una solución de Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y 0,05% Blocking Reagent (Boehringer) en agua destilada (TNB) a 37 °C por 20 minutos. A continuación se lavaron con una solución al 0,05% de tween-20 en 4XSSC (4T). Seguidamente se aplicaron 35 ul de solución de TNB con los anticuerpos estreptavidina y antidigoxigenina con una concentración de 10 ng/ul de cada uno y se encubaron en cámara húmeda por 45 minutos en la oscuridad. Seguidamente se lavaron en TNT por cinco minutos en la oscuridad a RT y se deshidrataron con un lavado en etanol 70% seguido de otro en etanol al 100% para dejarlos secar al aire en oscuridad y a RT. Seguidamente las preparaciones se contratiñeron con 4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato (DAPI, Sigma D9542), 35 ul por preparación, se cubrieron con cubre objetos y se encubaron por cinco minutos en cámara húmeda en la oscuridad y RT. Por último se lavaron por cinco minutos con agitación en agua estéril en oscuridad y a RT, seguido de la cual se deshidrataron en etanol en la misma secuencia que las veces anteriores, pero únicamente por un minuto. Las preparaciones se dejaron secar en la oscuridad y se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su análisis en el microscopio.

Procesado de las imágenes fotográficas

La detección de las sondas se realizó con un microscopio LEICA DMR usando los filtros apropiados. Las imágenes se tomaron con una cámara SPOT Jr

CCD. Las imágenes se procesaron con el programa de cómputo Spot Jr (Diagnostics Instruments, Inc.).

RESULTADOS

Sonda de rDNA

La sonda rDNA produjo señales fuertes, de intensidad similar, en cuatro de los 14 cromosomas de *P. sativum*, mientras que en *P. fulvum* la misma sonda originó seis señales, dos de intensidad similar a las observadas en *P. sativum* y dos de intensidad media (Figura 1). Estos resultados indican que *P. sativum* presentó dos pares de NOR mientras que *P. fulvum* presentó tres pares. En las muestras de las plantas F₄, la sonda hibridó en cuatro sitios del genoma con señales de alta intensidad y en dos sitios con intensidad muy baja (Figura 2). Estas señales corresponderían con los NOR en ambas especies parentales. En una de las muestras F₄ que se evaluaron, además de las cuatro señales de hibridación, se observó una señal intersticial de intensidad muy baja (Figura 2). *P. sativum* tiene dos NOR (cromosomas 4 y 7) (Fuchs *et al.* 1998, Samatadze *et al.* 2002) mientras que *P. fulvum* tiene tres (cromosomas 4, 7 y 5) (Errico *et al.* 1991, Errico *et al.* 1996, 1997) de ahí que los cromosomas de *P. sativum* en los que se observaron las señales (Figura 1 A, B, C) corresponderían a los pares 4 y 7 (Fuchs *et al.* 1998, Samatadze *et al.* 2002) y en *P. fulvum* serían

los pares 4, 7 y 5. La intensidad de las señales FISH se relaciona con el número de veces que la secuencia se repite en cada sitio (Sadder y Weber 2002).

Las imágenes obtenidas muestran con claridad que los NOR en *P. sativum* se localizan próximos a los telómeros, mientras que en *P. fulvum*, al menos uno de ellos está en una zona intersticial de uno de los cromosomas (Figura 1).

Las señales de la sonda de rDNA en algunos de los NOR de *P. sativum* (Figura 1A y B1) y de *P. fulvum* (Figura 1D) mostraron un halo de hibridación débil, lo que indica la desconcensación de esa región cromosómica.

La Sonda Telomérica

La superposición de las imágenes obtenidas con las sondas de rDNA y la sonda telomérica generó señales naranja, que concuerdan con los NOR en ambas especies y en las plantas F₄, lo que se debe a que debido a la alta intensidad de las señales producidas por la sonda marcada con biotina, éstas son captadas por el microscopio aún cuando se utilice el filtro para visualizar las señales de las sondas marcadas con digoxigenina (Figuras 2C y 2F) igual situación ha sido reportada por Kolchinsky y Gresshoff (1994). La sonda telomérica hibridó en las regiones distales de los cromosomas de ambas especies de guisante, pero tanto la frecuencia como la intensidad fueron mayores en las preparaciones de *P. fulvum* (Figura 3). Tampoco

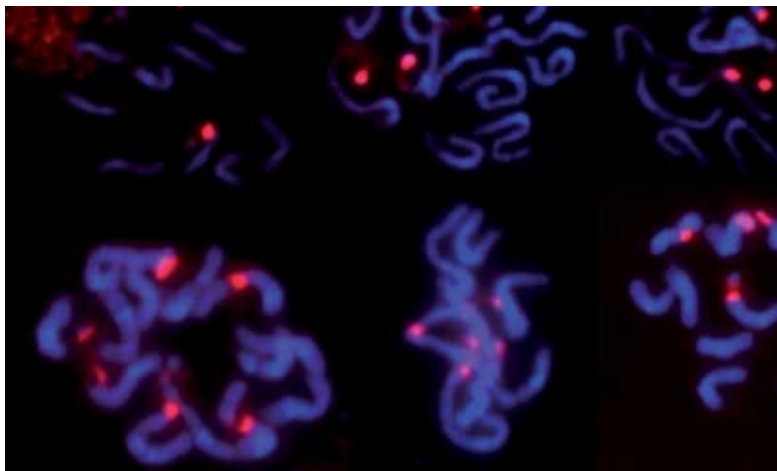


Figura 1. Metafase somática de *P. sativum* (A, B, C) y *P. fulvum* (D, E, F) hibridada con la sonda ribosómica marcada con biotina y detectados con rodamina. Los cromosomas se contratiñeron con DAPI. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes (ETSIAM). Universidad de Córdoba, España. 2006.

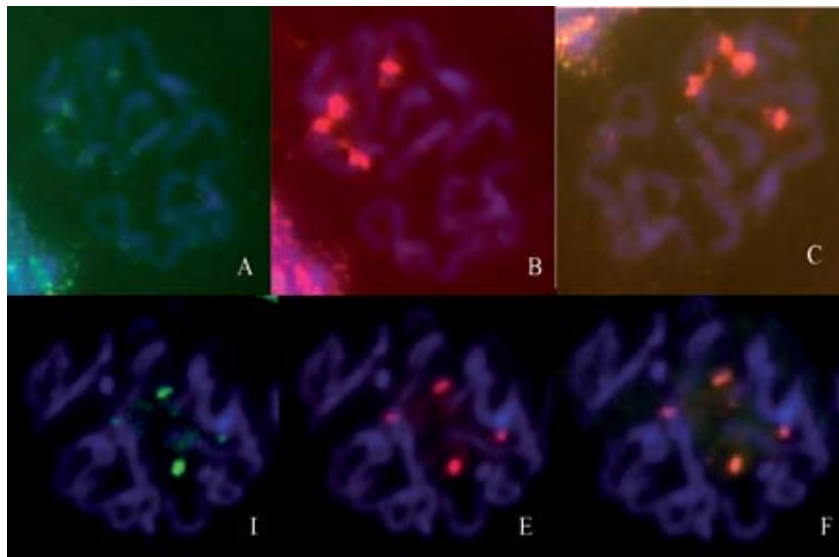


Figura 2. Metafases somáticas de dos plantas F_4 , hibridadas con la sonda telomérica, detectadas con fluoresceína (verde) (A y D) y con la ribosómica, marcados con biotina y detectados con rodamina (B y E) y la superposición de ambas imágenes (C y F). Los cromosomas se contratiñeron con DAPI. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes (ETSIAM). Universidad de Córdoba, España. 2006.

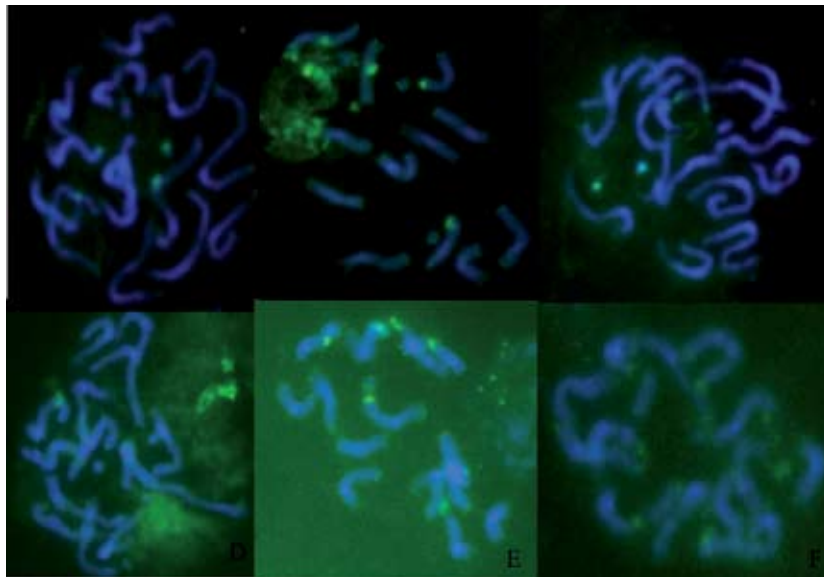


Figura 3. Metafases somáticas de *P. sativum* (A, B, C) y *P. fulvum* (D, E, F) hibridadas con la sonda telomérica, detectadas con fluoresceína (verde) con la sonda Telomérica y contra teñidos con DAPI. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes (ETSIAM). Universidad de Córdoba, España. 2006.

las señales fueron visibles con igual intensidad en todas las muestras ni en todos los cromosomas de una preparación, lo que concuerda con lo expuesto sobre este tema por Kolchinsky y Gresshoff (1994) quienes indican que secuencias subteloméricas y otras asociadas a los telómeros, son muy variables en el número de veces que se repiten y aún en cuanto a su ocurrencia en individuos de la misma especie. Este resultado indica que, al igual que otras muchas especies vegetales, los telómeros de *P. sativum* y *P. fulvum* comparten esta secuencia con *Arabidopsis thaliana*.

DISCUSIÓN

La hibridación fluorescente *in situ* de preparaciones cromosómicas de *Pisum sativum* y *P. fulvum* con sondas de rDNA y con la secuencia telomérica de *A. thaliana*, permitió establecer diferencias en la organización del genoma de ambas especies. Los resultados mostraron con claridad que ambas especies difieren en el número de NOR y que generaciones avanzadas, obtenidas por auto polinización y originadas del cruzamiento de ambas especies, tienen dos pares de NOR, número característica de *P. sativum* junto con una señal intersticial muy baja en un tercer par de cromosomas. También los datos permiten indicar que mientras que los NOR de *P. sativum* se localizan en la región distal de los cromosomas, en *P. fulvum* uno de ellos está localizado en la región meridional de un brazo en uno de los cromosomas.

La hibridación con la sonda telomérica de *A. thaliana*, en las regiones distales de los cromosomas de las muestras de *Pisum* analizadas, muestra que en los telómeros de este género también se encuentra la secuencia TTTAGGG. La presencia de esta secuencia en otra especies vegetales está bien documentada (Fuchs *et al.* 1998, Prieto *et al.* 2004, Sykorova *et al.* 2003) no así para el caso de *P. fulvum* o *P. sativum*.

Queda por evaluar un mayor número de líneas producto del cruzamiento entre ambas especies y ampliar el número de sondas, para comprender mejor las diferencias y semejanzas entre el genoma del guisante cultivado, su pariente silvestre y el de las progenies que se obtienen de su hibridación. Estos datos permitirían referenciar los mapas de ligamiento del género con posiciones físicas en los cromosomas, información que será de gran utilidad para la mejora genética de las especies cultivadas del género *Pisum*.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente apoyado por: Plan de Doctores Sistema INIAs-Ibero América, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) Costa Rica, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) Costa Rica, El Ministerio de Ciencia y Tecnología de Costa Rica (MICIT) y la Universidad de Córdoba, España.

El material vegetal fue suministrado por el Dr. Diego Rubiales, CSIC, Córdoba.

LITERATURA CITADA

- Adams, SP; Leitch, IJ; Bennett, MD; Leitch, AR. 2000. Aloe L. -a second plant family without (TTTAGGG)_n telomeres. *Chromosoma* 109: 201-205.
- Cabrera, A; Martin, A; Barro, F. 2002. *In situ* comparative mapping (ISCM) of Glu-1 loci in Triticum and Hordeum. *Chromosome Research* 10 (1): 49-54.
- Cerbah, M; Kevel, Z; Siljak-Yakovlev, S; Kkondorosi, E; Kondorosi, A. 1999. FISH Chromosome mapping allowing karyotype analysis in *Medicago truncatula* lines Jemalong J5 and R-108-1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12 (11): 947-950.
- Errico, A; Conicella, C; Taliercio, U. 1991. Cytological and morphological characterization of *Pisum sativum* and *Pisum fulvum* tetraploids. *Plant Breeding* 106 (2): 141-148.
- Errico, A; Conicella, C; Martino, TD; Ercolano, R; Monti, LM. 1996. Chromosome reconstructions in *Pisum sativum* through interspecific hybridization with *P. fulvum*. *Journal of Genetics and Breeding* 50 (4): 309-313.
- Errico, A; Conicella, C; Martino, TD; Ercolano, R; Monti, LM. 1997. Chromosome reconstructions in *Pisum sativum* through interspecific hybridization with *P. fulvum*. *Journal of Heredity* 50 (4): 309-313.
- Falstocco, E; Torricelli, R; Falcinelli, M. 2002. Genomic relationships between *Medicago murex* Willd. and *Medicago lesinsii* E. Small. investigated by *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 105 (6-7): 829-833.

- Fondevilla, S. 2005. Mejora del guisante para resistencia a jopo (*Orobancha crenata*), ascoquitosis (*Mycosphaerella pinodes*) y oidio (*Erysiphe pisi*) mediante mejora clásica y marcadores moleculares. Tesis Doctor. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. 163 p.
- Fondevilla, S; Avila, CM; Cubero, JI; Rubiales, D. 2005. Response to *Mycosphaerella pinodes* in a germplasm collection of *Pisum* spp. *Plant Breeding* 124 (3): 313-315.
- Fuchs, J; Kühne, M; Schubert, I. 1998. Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent *in situ* hybridization. *Chromosoma* 107 (4): 272-276.
- Hardie, DC; Baker, GJ; Marshall, DR. 1995. Field screening of *Pisum* accessions to evaluate their susceptibility to the pea weevil (Coleoptera: Bruchidae). *Euphytica*. 84 (2): 155-161.
- Kolchinsky, A; Gresshoff, P. 1994. Plant telomeres as molecular markers. In: Gresshoff, P. ed. *Plant Genome Analysis*. Boca Raton, US, CRC. p 113-124.
- Ochatt, SJ; Benabdelmouna, A; Marget, P; Aubert, G; Moussy, F; Pontecaille, C; Jacas, L. 2004. Overcoming hybridization barriers between pea and some of its wild relatives. *Euphytica* 137: 353-359 p.
- Pedrosa, A; Sandal, N; Stougaard, J; Schweizer, D; Bachmair, A. 2002. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161 (4): 1661-1672.
- Prieto, P; Martín, A; Cabrera, A. 2004. Chromosomal distribution of telomeric and telomeric-associated sequences in *Hordeum chilense* by *in situ* hybridization. *Hereditas* 141: 1-4.
- Richards, EJ; Ausubel, FM. 1988. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53 (1): 127-136.
- Sadder, MT; Weber, G. 2002. Comparison between genetic and physical maps in *Zea mays* L. of molecular markers linked to resistance against *Diatraea* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 104 (6 - 7): 908-915.
- Samatadze, TE; Muravenko, OM; Bol'sheva, NL; Amosova, AB; Gostimski, SA; Zelenin, AV. 2005. Investigation of chromosomes in varieties and translocation lines of pea *Pisum sativum* L. by FISH, Ag-NOR, and differential DAPI staining. *Genetika* 41 (12): 1665-1673.
- Samatadze, TE; Muravenko, OV; Zelenin, AV; Gostimskii, SA. 2002. Identification of the pea (*Pisum sativum* L.) genome chromosomes using C-banding analysis. *Doklady Biological Sciences* 387 (1-6): 577-580.
- Schmidt, T; Schwarzacher, T; Heslop-harrison, JS. 1994. Physical mapping of rRNA genes by fluorescent *in situ* hybridization and structural analysis of rRNA genes and intergenic sequences in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theoretical and Applied Genetics* 88: 629-636.
- Schneider, A; Linc, G; Molnar-Lang, M. 2003. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breeding* 122 (5): 396-400.
- Schwarzacher, T. 2003. Meiosis recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent *in situ* hybridization data in plants. *Journal of Experimental Botany* 54 (380): 11-23.
- Sharma, B; Yadav, Y. 2003. *Pisum fulvum* carries a recessive gene for powdery mildew resistance. *Pisum Genetics* 35: sp.
- Soliman, MH; Rubiales, D; Cabrera, A. 2001. A fertile amphiploid between durum wheat (*Triticum turgidum*) and the \times *Agroticum* amphiploid (*Agropyron cristatum* \times *T. tauschii*). *Hereditas* 135 (2-3): 183-186.
- Stephens, JL; Brown, RN; Lapitan, NLV; Knudson, DL. D. L. 2004. Physical mapping of barley genes using an ultrasensitive fluorescence *in situ* hybridization technique. *Genome* 47 (1): 179.
- Sykorova, E; Lim, KY; Chase, MW; Knapp, S; Leitch, IJ; Leitch, AR; Fajkus, J. 2003. The absence of Arabidopsis-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae): first evidence from eudicots. *The Plant Journal* 34 (3): 283-291.
- Tar'an, B; Warkentin, T; Somers, DJ; Miranda, D; Vandenberg, A; Blade, S; Woods, S; Bing, D; Xue, A; Dekoeyer, D; Penner, G. 2003. Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to mycosphaerella blight in field pea (*Pisum*

- sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107 (8): 1482-1491.
- Tar'an, B; Zhang, C; Warkentin, T; Tullu, A; Vandenberg, A. 2005. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular makers, and morphological and physiological characters. *Genome* 48 (2): 257-272.
- Vischi, M; Jurman, I; Bianchi, G; Morgante, M. 2003. Karyotype of Norway spruce by multicolor FISH. *Theoretical and Applied Genetics* 107 (4): 591-597.