

УДК 631.523:577.21:635.25

**СКРИНИНГ ВАС-БИБЛИОТЕКИ ЛУКА БАТУНА  
(*ALLIUM FISTULOSUM* L.) НА ПРИЦЕНТРОМЕРНЫЙ ПОВТОР  
С ПОМОЩЬЮ ДНК-ЗОНДА И FISH-АНАЛИЗА**

М.А. ШЕЙХ БЕЙГ ГОХАРРИЗИ, А.В. КИСЕЛЕВА, Л.И. ХРУСТАЛЕВА

РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

*Библиотеки бактериальных искусственных хромосом (Bacterial Artificial Chromosome, ВАС) широко используются при анализе геномов и поиска маркеров для идентификации индивидуальных хромосом. ВАС клоны в сочетании с флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) являются эффективным методом для исследования генома и физического картирования. В работе отражается проведенный ПЦР-анализ 1016 ВАС клонов геномной ДНК *Allium fistulosum*. В качестве ДНК-зонда для отбора ВАС клонов, несущих прицентромерный повтор, использовали праймеры AfIT32. Данные праймеры были получены авторами ранее при биоинформатическом анализе полностью секвенированного одного ВАС клона из библиотеки геномной ДНК *A. fistulosum*. В результате ПЦР-скрининга выявлено три ВАС клона, содержащих данный тандемный повтор. С помощью FISH с отобранными ВАС клонами показана их локализация в прицентромерной области на хромосомах 5 и 6. Полученные цитогенетические маркеры могут быть использованы для интегрирования генетических и физических карт *A. fistulosum* и в селекционных программах. Дальнейший анализ и секвенирование ВАС клонов позволит выяснить то, какие повторы и другие элементы генома (в том числе гены) расположены рядом с изучаемым прицентромерным повтором, входит ли AfIT32 в состав центромерной области и сколько копий этого повтора в геноме. Эти данные пополняют знания о формировании структуры прицентромерной и центромерной области хромосом растений и их эволюции.*

**Ключевые слова:** *Allium fistulosum*, ВАС клоны, прицентромерный повтор, FISH.

Библиотеки бактериальных искусственных хромосом (Bacterial Artificial Chromosome, ВАС) являются одним из главных инструментов анализа геномов. С помощью ВАС векторов можно клонировать последовательности ДНК больших размеров, до 300 тыс. пар нуклеотидов [36]. Геномные ДНК-библиотеки уже получены для таких важных сельскохозяйственных культур, как сорго [40], рис [39], пшеница [23], картофель [33] и лук репчатый [34]. Ранее нами была создана ВАС библиотека геномной ДНК лука-батуна, *A. fistulosum* [1]. Лук-батун является донором ценных генов для селекции лука репчатого – таких, как устойчивость к луковой листовой гнили [4], розовой корневой гнили [26], антракнозу [7], луковой мухе [5]. Кроме того,

лук-батун по сравнению с луком репчатым обладает высоким содержанием сухого вещества, более острым вкусом и морозостойкостью, более ранним и более коротким цветением, большей привлекательностью соцветий для насекомых-опылителей [37]. В 2013 г. был *начат проект по секвенированию генома A. fistulosum университетом Миссури (USA)*.

Центромерная последовательность ДНК является важным элементом хромосомы, которая участвует в правильном расхождении сестринских хроматид при делении клетки. Изучение молекулярной структуры центромеры затрудняется тем, что ее последовательность представлена гомогенной высокоповторяющейся ДНК, составляющей миллионы пар нуклеотидов. Такая структура центромеры создает трудности при секвенировании и сборке геномов. Первая центромера растений, которая была полностью секвенирована, – это центромера хромосомы 8 риса [24]. Несмотря на универсальность функции центромеры у всех организмов, ДНК-последовательность центромеры часто видо- и хромосомспецифична [8, 10, 16]. Недавно хромосомспецифичные повторы были выявлены в центромере картофеля [9]. Об организации центромерного повтора луковых практически ничего неизвестно. В недавней работе с помощью хроматин-иммунопреципитации с антителом на центромерспецифичный гистон CENH3 были выявлены части центромерного повтора *A. fistulosum*, который при FISH-гибридизации имел сигналы в центромерном регионе всех 16 хромосом лука батунa [25]. Однако полностью изучить организацию данного повтора у *A. fistulosum* пока не удалось. В недавней работе с помощью хроматин-иммунопреципитации с антителом на центромерспецифичный гистон CENH3 были выявлены части центромерного повтора. Нами был выявлен и секвенирован ВАС клон, несущий прицентромерный повтор AfT32 [2]. Пока не доказано, что AfT32 входит в структуру функциональной центромеры. С помощью флуоресцентной *in situ* гибридации (FISH) мы установили, что данный повтор локализуется в прицентромерной области хромосомы 5. В недавней работе с помощью хроматиниммунопреципитации с антителом на центромерспецифичный гистон CENH3 были выявлены части центромерного повтора *A. fistulosum*. Поэтому мы назвали этот повтор прицентромерным [2].

ВАС клоны в сочетании с FISH являются эффективным методом для исследования генома и физического картирования. ВАС-FISH был успешно использован для создания хромосом специфических маркеров с целью идентификации индивидуальных хромосом картофеля [33]. ВАС-FISH-картирование хромосомы 1 сорго показало, что данный подход гораздо эффективнее для создания хромосомспецифичных маркеров, чем отбор с помощью проточной цитометрии или микродессекции [13]. FISH-картирование ВАС клонов было ключевым моментом в секвенировании хромосомы 6 томатов [35].

В работе был проведен скрининг 1016 ВАС клонов на наличие прицентромерного повтора AfT32. В результате ПЦР-анализа было выявлено три ВАС клона с прицентромерным повтором. FISH-картирование отобранных клонов подтвердило их локализацию в прицентромерных областях хромосомы 5 и 6 *A. fistulosum*.

Материалы и методы исследования. Растительный материал. В работе были использованы семена лука батунa, *A. fistulosum* ( $2n = 2x = 16$ ), сорт Русский Зимний, предоставленные компанией «Гавриш».

Скрининг ВАС-библиотеки. Скрининг ВАС-библиотеки был проведен с полученными ранее праймерами Af1T32 [2]:

R5' – TAGCGGAGTTTCAAATATGG-3'; F 5' – CCCACSTAAATTACGGACA-3' с помощью пулов (каждый пул – 8 клонов). ПЦР-амплификация была выполнена в 20 µl смеси ПЦР, содержащей 1X буфер Taq; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 dNTP; 10µM праймера, 0,5 U Taq полимеразы и 10 нг ВАС-ДНК. Условия ПЦР: 94°C – 1 мин; 35 циклов: 94°C – 1 мин, 57°C – 1мин, 72°C – 1мин; последняя элонгация 72°C – 3 мин.

Приготовление препаратов митотических хромосом. Семена *A. fistulosum* сорта Русский зимний были выращены на влажной фильтровальной бумаге в течение 72 ч при 25°C, затем обработаны N<sub>2</sub>O в камере под давлением 10 атмосфер в течение 3 ч. Фиксация корней проводилась в смеси этанол: уксусная кислота (3:1). Приготовление препаратов хромосом проводили методом «SteamDrop» [18].

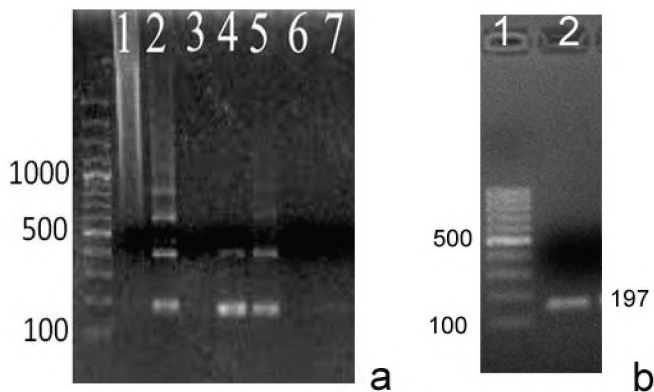
Плазмидная ДНК ВАС клонов была выделена путем щелочного лизиса с последующей фенолхлороформ-очисткой. Плазмидная ДНК была мечена Biotin-16-dUTP, ПЦР-продукт tandemного повтора был мечен Dig-11-dUTP с помощью Nick-трансляции (Roche, Mannheim, Germany).

**FISH.** FISH была проведена по методу, описанному ранее Khrestaleva and Kik [17]. Гибридизационная смесь состояла из 50% (v/v) деионизированного формамида, 10% (w/v) декстрансульфата, 2 × SSC, 0,25% натрия додецилсульфата, 2,5 нг/мкл ДНК пробы. Смесь денатурировали при 80 °C в течение 10 мин. Жесткость гибридизации – 78%. Жесткость отмывки – 80%. Детекцию сайтов гибридизации с Biotin-16-dUTP-пробой проводили с помощью Streptavidin-Cy<sub>3</sub>, Anti-Streptavidin-Biotin, Streptavidin-Cy<sub>3</sub> (Vector Laboratories, USA), а проб, меченных Dig-11-dUTP, – с помощью anti-digoxigenin-FITC антител (Roche, Mannheim, Germany) в соответствии с прилагаемыми протоколами.

Микроскопия и анализ изображения. Препараты анализировались на флуоресцентном микроскопе AxioImager M1 (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany) с использованием цифровой камеры AxioCam MRm. Обработку изображений производили с помощью программы Axio Vision, версия 4.6.3 (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany). Изображения были оптимизированы с помощью функции контраста и яркости в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc., San Jose, California, USA).

Кариотипирование. Кариотипирование было проведено согласно стандартной номенклатуре для луков, предложенной Kalkman [15] и одобренной на 4-м симпозиуме Эукарпия по луковым (the Fourth Eucarpia Allium Symposium) [38]. Морфометрия хромосом была выполнена с использованием программы MicroMeasure [29].

Результаты и их обсуждение. Скрининг ВАС-библиотеки. В качестве ДНК-зонда для отбора ВАС клонов, несущих прицентромерный повтор, использовали праймеры Af1T32. В результате ПЦР-анализа 1016 ВАС клонов, несущих вставку геномной ДНК *A. fistulosum* со средним размером 30 тыс. пар нуклеотидов, продукт амплификации был получен на трех клонах: 10.11.3, 11.4.2 и 11.4.7, что свидетельствует по крайней мере о наличии сайтов отжига для праймеров Af1T32 в этих клонах (рис. 1a). При амплификации был получен фрагмент ДНК ожидаемой длины в 197 п.н. (пар нуклеотидов), а также более длинные фрагменты, которые были вырезаны из геля и снова амплифицированы с этими же праймерами. В результате был получен ПЦР-продукт в 197 п.н., что свидетельствует о tandemной организации «Голова-хвост» данного повтора (рис. 1b).

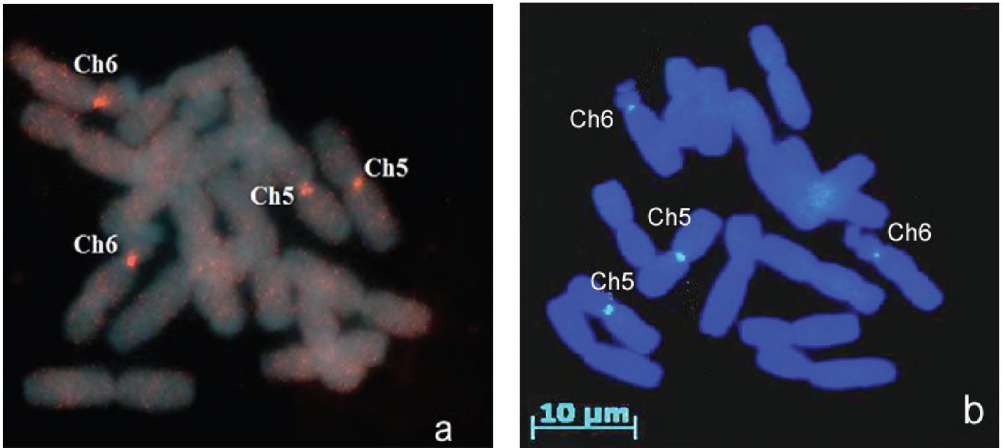


**Рис. 1.** Результаты ПЦР амплификации с праймерами AfT32: а) с плазмидной ДНК ВАС клонов: 1-10.10.3, 2-10.11.3, 3-5.2.2, б) 4-11.4.2, 5-11.4.7, 6-11.4.8, 7-10.11.4; б) повторная амплификация с ПЦР продуктами, полученными с этими ВАС клонами: 2-197 п.н. фрагмент; маркер размеров 100 бр.

Ранее проведенный нами биоинформатический анализ с помощью программы Tandem Repeats Finder секвенированного ВАС клона 5.10.7 также свидетельствовал о тандемной организации этого повтора в геноме *A. fistulosum* [2]. Такая организация повторов в тандемные ряды характерна для изученных центромерных последовательностей ДНК у эукариот включая человека, дрозофилу, мышь, рис, кукурузу и др. [11, 14]. Тандемная организация повторов была показана также при клонировании и анализе центромерспецифичного повтора сорго [22]. Однако тандемная организация повторов характерна не только для центромеры. Тандемные повторы довольно часто встречаются в геноме растений [21, 32]. Обычно тандемные повторы связаны с такими структурами хромосомы, как теломера, центромера, субтеломера и гетерохроматиновые области [21, 30]. Ранее проведенный нами анализ субтеломерного повтора у *A. fistulosum* показал тандемную организации «Голова-хвост» сателлитного повтора размером 378 п.н. [6].

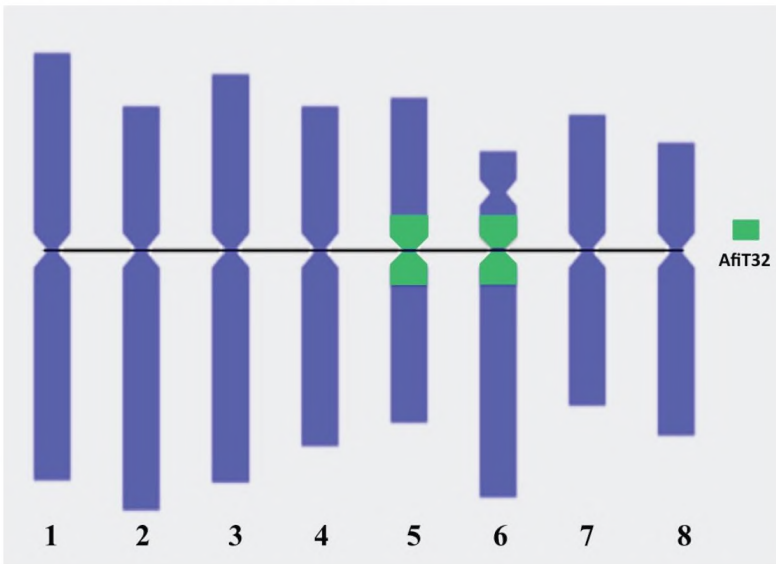
**BAC-FISH.** Отобранные ВАС клоны, несущие вставку AfT32 тандемного повтора, были помечены Biotin-16-dUTP с помощью Nick-трансляции и использованы в качестве пробы в FISH-эксперименте на митотических метафазных хромосомах *A. fistulosum*. В результате FISH-анализа всех трех клонов выявлены флуоресцентные сигналы в области центромеры на четырех хромосомах (рис. 2а).

Следует отметить, что при *in situ* гибридизации с меченой плазмидной ДНК ВАС клонов по всей длине хромосом наблюдался слабый флуоресцирующий сигнал (рис. 2а), что свидетельствует о наличии в ВАС клонах, кроме прицентромерного повтора, других последовательностей геномной ДНК, которые разбросаны по всему геному. Это ожидаемый результат, так как геномы растений насыщены диспергированными повторами [31] и LTR-ретротранспозонами включая *Ty1/copia* и *Ty3/gypsy* [12, 20, 27, 28]. Поэтому имеется большая вероятность того, что диспергированные по геному повторы попадут в большинство ВАС клонов. Когда в качестве пробы мы использовали ПЦР продукт, полученный с AfT32 праймерами и отобранными ВАС клонами в качестве матричной ДНК, то не наблюдали диспергированных сигналов, а были выявлены локализованные сигналы в области центромеры на четырех хромосомах (рис. 2б).



**Рис. 2.** а) FISH с BAC клоном 10.11.3, несущим вставку прицентромального тандемного повтора AfT32, на митотических метафазных хромосомах *A. fistulosum* (красная флуоресценция);  
 б) FISH с ПЦР продуктом, полученным с AfT32 праймерами и BAC клоном 10.11.3 в качестве матричной ДНК (зеленая флуоресценция)

Кариотипирование показало, что сигналы локализованы на двух гомологичных хромосомах 5 (относительная длина –  $11,5 \pm 1,5$ , центромерный индекс –  $47,9 \pm 1,9$ ) и на двух гомологичных хромосомах 6 (относительная длина –  $11,9 \pm 0,3$ , центромерный индекс –  $18,2 \pm 2,6$ ). На рисунке 3 представлена идиограмма кариотипа митотических метафазных хромосом *A. fistulosum* с указанным положением гибридизации анализируемых BAC клонов.



**Рис. 3.** Идиограмма кариотипа *A. fistulosum* с хромосомной локализацией прицентромального повтора

Наличие хромосомспецифичных локализованных повторов сообщается в ВАС-FISH-картировании на хромосомах проса [3], сорго [13], люпина [19] и картофеля [33]. Дальнейший анализ и секвенирование ВАС клонов позволят выяснить, какие повторы и другие элементы генома (в том числе гены) расположены рядом с изучаемым прицентромерным повтором, а также то, входит ли AfT32 в состав центромерной области и сколько копий этого повтора в геноме. Эти данные пополнят наши знания о формировании структуры прицентромерной и центромерной области хромосом растений и их эволюции.

Выводы. В результате ПЦР-скрининга ВАС-библиотеки *A. fistulosum* были выявлены три ВАС клона, несущие тандемный повтор AfT32. FISH с этими ВАС клонами показал, что данный повтор локализуется в области центромеры хромосом 5 и 6. Полученные цитогенетические маркеры могут быть использованы для интегрирования генетических и физических карт *A. fistulosum* и в селекционных программах для мониторинга интрогрессии генетического материала от донора к реципиенту.

Благодарим за финансовую поддержку Министерство образования и науки Российской Федерации: аспирантский проект VN258163, выполняемый Мохаммад Али Шейх Бейг Гохаризи, Иран.

### Библиографический список

1. Киселева А.В., Фесенко И.А., Хрусталева Л.И. Создание геномной ВАС библиотеки *Allium fistulosum* L. для получения цитогенетических маркеров // Известия ТСХА. 2012. № 6. С. 3-39.
2. Киселёва А.В. Создание геномной ВАС библиотеки *Allium fistulosum* L. и ее использование в молекулярно-цитогенетических исследованиях: Автореферат диссертации. Москва, 2013. С. 24.
3. Akiyama Y., Conner Y., Goel S. High-Resolution Physical Mapping in *Pennisetum squamulatum* Reveals Extensive Chromosomal Heteromorphism of the Genomic Region Associated with Apomixis // Plant Physiology. 2004. № 134. P. 1733-1741.
4. Currah L., Maude R.B. Laboratory tests for leaf resistance to *Botrytis squamosa* in onions // Ann Appl Biol. 1984. № 105. P. 277-283.
5. De Ponti O.M.B., Inggamer H. Resistance to the onion fly in *Allium cepa* and *Allium fistulosum* / ed. Q.P. van der Meer // Proc 3rd Eucarpia Allium Symp. PUDOC Wageningen, the Netherlands. 1984. P. 21-23.
6. Fesenko I.A., Khrustaleva L.I., Karlov G.I. Organization of the 378 bp satellite repeat in terminal heterochromatin of *Allium fistulosum* // Russian Journal of Genetics. 2002. № 38 (7). P. 745-753.
7. Galvan G.A., Wietsma W.A., Putrasamedja S., Permadi A.H., Kik C. Screening for resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) in *Allium cepa* and its wild relatives // Euphytica. 1997. № 95. P. 173-178.
8. Gindullis F.C., Desel I., Galasso T. Schmidt The large-scale organization of the centromeric region in Beta species // Genome Res. 2001. № 11. P. 253-265.
9. Gong Z., Wu Y., Kobzikova A. et al. Repeat less and Repeat-Based Centromeres in Potato: Implications for Centromere Evolution // The Plant Cell. 2012. V. 24. № 9. P. 3559-3574.
10. Harrison G.E., Heslop-Harrison J.S. Centromeric repetitive DNA sequences in the genus Brassica // Theor. Appl. Genet. 1995. № 90. P. 157-165.
11. Henikoff S. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA / S. Henikoff, K. Ahmad, H.S. Malik // Science. 2001. № 293. P. 1098-1102.
12. Hertweck K. Assembly and comparative analysis of transposable elements from low coverage genomic sequence data in *Asparagales* // Genome. 2013. № 56(9). P. 487-494.

13. Islam-Faridi M.N., Childs K., Klein P.E. et al. A molecular cytogenetics map of sorghum chromosome 1: fluorescence in situ hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes // *Genetics*. 2002. № 161. P. 345-353.
14. Jiang J., Birchler J.B., Parrott W.A., Dawe R.K. A molecular view of plant centromeres // *Trends Plant Sci*. 2003. № 8. P. 570-575.
15. Kalkman E.R. Analysis of the C-banded karyotype of *Allium cepa* L. Standard system of nomenclature and polymorphism // *Genetica*. 1984. № 65. P. 141-148.
16. Kamm A. Analysis of a repetitive DNA family from *Arabidopsis arenosa* and relationship between *Arabidopsis* species // *Plant Mol. Biol.* 1995. № 27 (5). P. 853-862.
17. Khrustaleva L.I., Kik C. Cytogenetical studies in the bridge cross *Allium cepa* x (*A. fistulosum* x *A. roylei*) // *TheorAppl Genet*. 1998. № 96. P. 8-14.
18. Kirov I., Divashuk. M., Van Laere V., Soloviev A., Khrustaleva I. An easy «Steam-Drop» method for high quality plant chromosome preparation // *Molecular Cytogenetics*. 2014. № 7. P. 21.
19. Książkiewicz M., Katarzyna W., Szczepani A. et al. Comparative genomics of *Lupinus angustifolius* gene-rich regions: BAC library exploration, genetic mapping and cytogenetics // *BMC Genomics*. 2013. № 14.
20. Kumar A., Pearce S.R., McLean K. et al. The Ty1 copiangroup of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers // *Genetica*. 1997. № 6. P. 205-217.
21. Mehrotra S., Goyal V. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2014. № 12(4). P. 71-164.
22. Miller J.T., Jacko S.A., Nasuda S. et al. Cloning and characterization of a centromere-specific repetitive DNA from *Sorghum bicolor* // *heor and Appl Genet*. 1998. № 9. P. 832-839
23. Moullet O., Zhang H.B., Lagudah E.S. Construction and characterization of a large DNA insert library from the D genome of wheat // *Theor. Appl. Genet*. 1999. № 99. P. 305-313.
24. Nagaki K., Cheng Z., Ouang S. et al. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes // *Nature genetics*. 2004. № 36(2). P. 138-145.
25. Nagaki K., Yamamoto N., Yamaji Y., Mukai M. Murata Chromosome dynamics visualized with an anti-centromeric histone H3 antibody in allium // *PLoS One*. 2012. № 7(12). P. 513-515.
26. Netzer D., Rabinowitch H.D., Weintal Ch. Greenhouse technique to evaluate pink root disease caused by *Pyrenochaeta terrestris* // *Euphytica*. 1985. № 34. P. 385-391.
27. Pearce S.R., Pich U., Harrison G. et al. The Ty1\_copiangroup retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin // *Chromosome Res*. 1996. № 5. P. 357-364.
28. Pich U., Schubert I. Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in *Allium cepa* // *Chromosome Res*. 1998. № 4. P. 315.
29. Reeves A. and Tear J. MicroMeasure for Windows. Version 3.3. 2000 Available from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>. Cccessed 25. May 2016.
30. Sharma S., Raina S.N. (Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes // *Cytogenetic Genome Res*. 2005. № 109. P. 15-26.
31. Shibata F., Hizume M. The identification and analysis of the sequences that allow the detection of *Allium cepa* chromosomes by GISH in the allo-diploid *A. wakegi* // *Chromosoma*. 2002. V. 111. № 3. P. 184-191.
32. Schmidt T., Heslop-Harrison. J.S. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes // *Trends Plant Science*. 1998. № 5. P. 195-199.
33. Song J., Dong F., Jiang J. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research // *Genome*. 2000. № 43(1). P. 199-204.
34. Suzuki G.A., Ura N., Saito G.S., Do B.B., Seo M., Yamamoto Y. BAC FISH analysis in *Allium cepa* // *Genes Genet Syst*. 2001. № 76(4). P. 251-255.
35. Szinay D., Chang S.B., Khrustaleva L. et al. High-resolution chromosome mapping of BACs using multi-colour FISH and pooled-BAC FISH as a backbone for sequencing tomato chromosome 6 // *Plant J*. 2008. № 56. P. 627-637.



36. Tao Q., Zhang H.B. Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors // *Nucleic Acids Research*. 1998. № 26(21). P. 4901-4909.
37. Van der Meer Q.P., Bennekom van J.L. Improving the onion crop (*Allium cepa*L.) by transfer of characters from *Allium fistulosum* L. // *Biul Warzywniczy*. 1978. № 22. P. 87-91.
38. Vries J.N. de. Onion chromosome nomenclature and homoeology relationships – workshop report / J.N. de Vries // *Euphytica*. 1990. № 49. P. 1-3.
39. Wang G.L., Holsten T.E., Song W.Y., Wang H.P., Ronald P.C. Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the Xa-21 disease resistance locus // *Plant J*. 1995. № 7. P. 525-533.
40. Woo S.S., Jiang J., Gill B.S. et al. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor* // *Nucl. Acids Res*. 1994. № 22. P. 4922-4931.

## SEARCHING FOR BAC CLONES CONTAINING PERICENTROMERIC REPEATS OF BUNCHING ONION (*ALLIUM FISTULOSUM* L.) USING PCR AND FISH ANALYSIS

M.A. SHEIKH BEIG GOHARRIZIM, A.V. KISELEVA, L.I. KHRUSTALEVA

*Bacterial artificial chromosome (BAC) libraries are being used widely in genome researches and developing of markers for identification of individual chromosomes. A combination of BAC clones that possess insertion of large genomic DNA fragments and fluorescence in situ hybridization (FISH) is a powerful tool for genome studies and physical mapping. In this work a PCR analysis of 1016 BAC clones from the A. fistulosum genomic DNA library with primers designed on AfiT32 tandem repeat has been done. The primers were obtained based on bioinformatics analysis of the completely sequenced one selected BAC clone in our previous research. It was revealed three BAC clones containing the AfiT32 repeat. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with the clones showed strong signal in pericentromeric regions of chromosomes 5 and 6 of A. fistulosum. These chromosomal markers may be used for integration of genetic and physical maps of A. fistulosum and in onion breeding programs. Future sequencing and analysis of the BAC clones allow us to shed light on genomic structure of pericentromeric and centromeric regions, to elucidate what other repeats, mobile elements and possibly genes are located in these chromosome regions, to answer the question whether the AfiT32 repeat is a part of functional centromere and to establish copy number of the tandem repeat presenting in genome. The data will add to our knowledge about structure of pericentromeric and centromeric regions and, in general, evolution of plant chromosome.*

**Key words:** *Allium fistulosum*, BAC clones, pericentromeric repeat, FISH.

### References

1. Kiseleva A.V., Fesenko I.A., Khrustaleva L.I. Sozdanie genomnoy VAS biblioteki *Allium fistulosum* L. Dlya polucheniya tsitogeneticheskikh markerov // *Izvestiya TSHA*. 2012. № 6. P. 31-39.
2. Kiseleva A.V. Sozdaniye genomnoy VAS biblioteki *Allium fistulosum* L. i ee ispol'zovanie v molekulyarno-tsitogeneticheskikh issledovaniyah: Avtoreferat dissertatsii. Moskva, 2013. P. 24.
3. Akiyama Y., Conner Y., Goel S. High-Resolution Physical Mapping in *Pennisetum squamulatum* Reveals Extensive Chromosomal Heteromorphism of the Genomic Region Associated with Apomixis // *Plant Physiology*. 2004. № 134. P. 1733-1741.
4. Currah L., Maude R.B. Laboratory tests for leaf resistance to *Botrytis squamosa* in onions // *Ann Appl Biol*. 1984. № 105. P. 277-283.



5. De Ponti O.M.B., Inggamer H. Resistance to the onion fly in *Allium cepa* and *Allium fistulosum* / ed. Q.P. van der Meer // Proc 3rd Eucarpia Allium Symp. PUDOC Wageningen, the Netherlands. 1984. P. 21-23.

6. Fesenko I.A., Khrustaleva L.I., Karlov G.I. Organization of the 378 bp satellite repeat in terminal heterochromatin of *Allium fistulosum* // Russian Journal of Genetics. 2002. № 38 (7). P. 745-753.

7. Galvan G.A., Wietsma W.A., Putrasemedja S., Permadi A.H., Kik C. Screening for resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) in *Allium cepa* and its wild relatives // Euphytica. 1997. № 95. P. 173-178.

8. Gindullis F.C., Desel I., Galasso T., Schmidt T. The large-scale organization of the centromeric region in Beta species // Genome Res. 2001. № 11. P. 253-265.

9. Gong Z., Wu Y., Kobylzkova A. et al. Repeat less and Repeat-Based Centromeres in Potato: Implications for Centromere Evolution // The Plant Cell. 2012. V. 24. № 9. P. 3559-3574.

10. Harrison G.E., Heslop-Harrison J.S. Centromeric repetitive DNA sequences in the genus Brassica // Theor. Appl. Genet. 1995. № 90. P. 157-165.

11. Henikoff S. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA / S. Henikoff, K. Ahmad, H.S. Malik // Science. 2001. № 293. P. 1098-1102.

12. Hertweck K. Assembly and comparative analysis of transposable elements from low coverage genomic sequence data in *Asparagales* // Genome. 2013. № 56(9). P. 487-494.

13. Islam-Faridi M.N., Childs K., Klein P.E. et al. A molecular cytogenetics map of sorghum chromosome 1: fluorescence in situ hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes // Genetics. 2002. № 161. P. 345-353.

14. Jiang J., Birchler, J.B., Parrott, W.A., Dawe, R.K. A molecular view of plant centromeres // Trends Plant Sci. 2003. № 8. P. 570-575.

15. Kalkman E.R. Analysis of the C-banded karyotype of *Allium cepa* L. Standard system of nomenclature and polymorphism // Genetica. 1984. № 65. P. 141-148.

16. Kamm A. Analysis of a repetitive DNA family from *Arabidopsis arenosa* and relationship between *Arabidopsis* species // Plant Mol. Biol. 1995. № 27 (5). P. 853-862.

17. Khrustaleva L.I., Kik C. Cytogenetical studies in the bridge cross *Allium cepa* x (*A. fistulosum* x *A. roylei*) // Theor Appl Genet. 1998. № 96. P. 8-14.

18. Kirov I., Divashuk M., Van Laere V., Soloviev A., Khrustaleva I. An easy «SteamDrop» method for high quality plant chromosome preparation // Molecular Cytogenetics. 2014. № 7. P. 21.

19. Książkiewicz M., Katarzyna W., Szczepani A. et al. Comparative genomics of *Lupinus angustifolius* gene-rich regions: BAC library exploration, genetic mapping and cytogenetics // BMC Genomics. 2013. № 14.

20. Kumar A., Pearce S.R., McLean K. et al. The Ty1 copigroup of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers // Genetica. 1997. № 6. P. 205-217.

21. Mehrotra S., Goyal V. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function // Genomics Proteomics Bioinformatics. 2014. № 12(4). P. 164-71.

22. Miller J.T., Jacko S.A., Nasuda S. et al. Cloning and characterization of a centromere-specific repetitive DNA from *Sorghum bicolor* // Theor and Appl Genet. 1998. № 9. P. 832-839.

23. Moullet O., Zhang H.B., Lagudah E.S. Construction and characterization of a large DNA insert library from the D genome of wheat // Theor. Appl. Genet. 1999. № 99. P. 305-313.

24. Nagaki K., Cheng Z., Ouang S. et al. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes // Nature genetics. 2004. № 36(2). P. 138-145.

25. Nagaki K., Yamamoto N., Yamaji Y., Mukai M. Murata Chromosome dynamics visualized with an anti-centromeric histone H3 antibody in allium // PLoS One. 2012. № 7(12). P. 513-515.

26. Netzer D., Rabinowitch H.D., Weintal Ch. Greenhouse technique to evaluate pink root disease caused by *Pyrenochaeta terrestris* // Euphytica. 1985. № 34. P. 385-391.

27. Pearce S.R., Pich U., Harrison G. et al. The Ty1 copigroup retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin // Chromosome Res. 1996. № 5. P. 357-364.

28. Pich U., Schubert I. Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in *Allium cepa* // Chromosome Res. 1998. № 4. P. 315.

29. Reeves A. and Tear, J. MicroMeasure for Windows. Version 3.3. 2000 Available from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>. Cccessed 25. May 2016.
30. Sharma S., Raina S.N. (Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes // Cytogenetic Genome Res. 2005. № 109. P. 15-26.
31. Shibata F., Hizume M. The identification and analysis of the sequences that allow the detection of *Allium cepa* chromosomes by GISH in the allodiploid A. wakegi // Chromosoma. 2002. V. 111. № 3. P. 184-191.
32. Schmidt T., Heslop-Harrison J.S. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes // Trends Plant Science. 1998. № 5. P. 195-199.
33. Song J., Dong F., Jiang J. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research // Genome. 2000. № 43(1). P. 199-204.
34. Suzuki G.A., Ura N., Saito G.S., Do B.B., Seo M., Yamamoto Y. BAC FISH analysis in *Allium cepa* // Genes Genet Syst. 2001. № 76(4). P. 251-255.
35. Szinay D., Chang S.B., Khrustaleva L. et al. High-resolution chromosome mapping of BACs using multi-colour FISH and pooled-BAC FISH as a backbone for sequencing tomato chromosome 6 // Plant J. 2008. № 56. P. 627-637.
36. Tao Q., Zhang H.B. Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors // Nucleic Acids Research. 1998. № 26(21). P. 4901-4909.
37. Van der Meer Q.P., Bennekom van J.L. Improving the onion crop (*Allium cepa* L.) by transfer of characters from *Allium fistulosum* L. // Biul Warzywnicy. 1978. № 22. P. 87-91.
38. Vries J.N. de. Onion chromosome nomenclature and homoeology relationships – workshop report / J. N. de Vries // Euphytica. 1990. № 49. P. 1-3.
39. Wang G.L., Holsten T.E., Song W.Y., Wang H.P., Ronald P.C. Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the Xa-21 disease resistance locus // Plant J. 1995. № 7. P. 525-533.
40. Woo S.S., Jiang J., Gill B.S. et al. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor* // Nucl. Acids Res. 1994. № 22. P. 4922-4931.

**Хрусталева Людмила Ивановна** – д.б.н., главный научный сотрудник Центра молекулярной биотехнологии, проф. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; тел.: 8 (499) 977-70-01; e-mail: [khrustaleva@timacad.ru](mailto:khrustaleva@timacad.ru); [ludmila.khrustaleva19@gmail.com](mailto:ludmila.khrustaleva19@gmail.com)

**Киселева Анна Витальевна** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБУ ГНИЦ ПМ; тел.: +7 (495) 790-71-72; e-mail: [sanyutabe@mail.ru](mailto:sanyutabe@mail.ru)

**Мохаммад Али Шейх Бейг Гохарризи** – аспирант кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; тел.: 8 (499) 977-70-01; e-mail: [sheikhbeig@gmail.com](mailto:sheikhbeig@gmail.com)

**Khrustaleva Lyudmila Ivanovna** – d.b.s., Chief research scientist of molecular biotechnology center, Professor of the Department of Genetics, Biotechnology, Selection and Seed Growing Russian Timiryazev State Agrarian University named after K.A. Timiryazev, tel.: 8 (499) 977-70-01; e-mail: [khrustaleva@timacad.ru](mailto:khrustaleva@timacad.ru); [ludmila.khrustaleva19@gmail.com](mailto:ludmila.khrustaleva19@gmail.com).

**Kiseleva Anna Vitalyevna** – k.b.s., Chief research scientist of molecular genetics laboratory FSBI SRDC PM, tel.: +7 (495) 790 71 72; e-mail: [sanyutabe@mail.ru](mailto:sanyutabe@mail.ru).

**Sheikh Beig Goharrizim Mokhammad Ali** – Ph.D. student of the Department of Genetics, Biotechnology, Selection and Seed Growing Russian Timiryazev State Agrarian University named after K.A. Timiryazev; tel.: 8 (499) 977-70-01; e-mail: [sheikhbeig@gmail.com](mailto:sheikhbeig@gmail.com).