

БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ

Известия ТСХА. выпуск 1. 2007 год

УДК 631.523:577.21

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЦИТОГЕНЕТИКА В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Л.И. ХРУСТАЛЕВА

(Центр молекулярной биотехнологии)

Данный обзор о последних достижениях в области молекулярной цитогенетики адресован широкому кругу селекционеров и генетиков, кто желает понять принципы современных молекулярных технологий и использовать этот мощный инструмент в своей работе. Геномная *in situ* гибридизация (GISH) позволяет различать родительские геномы в межвидовых гибридах. Рассматриваются основы этого метода и демонстрируется на конкретных примерах его использование в селекции. Обсуждаются вопросы несовпадения генетических и физических карт: близко стоящие маркеры на генетической рекомбинационной карте в местах супрессии рекомбинаций могут быть физически значительно удалены друг от друга. Описываются методы интегрирования рекомбинационных и физических карт. Наконец, рассматриваются возможности физического картирования генов с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Обсуждаются проблемы картирования генов на растительной хромосоме. Описывается разработанный автором высокочувствительный Tyramide-FISH метод, позволяющий детектировать последовательности ДНК малых размеров (710 п.н.) и его применение для анализа трансгенных растений и физического картирования EST (expressed sequence tag) клонов.

О том, какую роль сыграла цитогенетика в селекции растений, говорят работы нашего гениального соотечественника Георгия Дмитриевича Карпеченко, выполненные им в 20-30-х гг. прошлого столетия [1 — 5]. Разработанные Г.Д. Карпеченко теория отдаленной гибридизации и способ преодоления нескрещиваемости видов путем удвоения числа хромосом вошли во все учебники мира по генетике и селекции культурных растений. Фундаментальные исследования по эволюции хромосом и анализу соматического числа хромосом у многочисленных видов растений показали, что в видообразовании играет роль умножение хромосомного комплекса. Собственно на этом явлении основаны широко используемые в селекции приемы полиплоидизации и гаплоидизации. Перестройки в единичных хромосомах, такие как де-

леции и транслокации, могут привести к появлению новых признаков. Эти знания, полученные цитогенетиками, также сослужили хорошую службу для селекционеров. Воздействуя физическими или химическими мутагенами, получают формы растений с различными хромосомными перестройками, которые представляют собой важный материал для задач селекционеров. Анализ поведения хромосом в мейозе является критическим моментом для прогнозирования плодовитости и константности гибридов и полиплоидов.

Открытие в 1953 г. структуры и функции ДНК стало революционной вехой в генетике. Бурное развитие молекулярной генетики предоставило селекционерам мощный инструмент для создания новых сортов — молекулярное маркирование. Молекулярное мар-

кирование, основанное на полиморфизме ДНК-последовательностей, стало весомой частью «новой генетики». Технологии молекулярного маркирования позволили во-первых, — непосредственно по генотипу оценивать формы, вовлеченные в селекционный процесс и, во-вторых, вести отбор на устойчивость к фитопатогенам без проведения трудоемких экспериментов на фоне фитопатогенов. Поэтому молекулярное маркирование быстро и охотно было принято селекционерами, и даже появился такой термин «marker assisted selection» — селекция с помощью маркеров. Использование методов классической цитогенетики в селекционном процессе было на какое-то время отодвинуто на второй план. Однако с разработкой новых технологий, а именно, флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) открылись огромные возможности для исследований в области фундаментальной цитогенетики и ее практическом применении в селекции растений [49]. FISH технологии основаны на гибридизации меченой флуорохромом ДНК-пробы с комплементарной к ней последовательностью ДНК-хромосомы, что позволяет физически картировать на хромосомах различные последовательности ДНК, визуализировать родительские геномы в межвидовом гибриде и таким образом следить за интрогрессией генетического материала от одного родителя к другому.

В настоящем обзоре представлены достижения в области молекулярной цитогенетики в свете их применения в селекции растений. Материал в основном иллюстрирован результатами собственных исследований, проведенных в Центре молекулярной биотехнологии РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева, Международном центре исследования растений в Вагенингене и на кафедре генетики Вагенинского аграрного университета (Нидерланды). Основной задачей, которую преследовал автор при написании этой статьи, было привлечь внимание селекционеров к

этой быстро развивающейся области науки и активно использовать новые разработки молекулярной цитогенетики для успешного и ускоренного создания новых сортов с.-х. культур.

Визуализация геномов родителей у гибридов и мониторинг интрогрессии генетического материала с помощью GISH

Отдаленная гибридизация и перенос ценных генов от диких сородичей в культурные растения является важной стратегией в селекции. Надежная идентификация хромосом родителя в геноме гибрида позволяет вести мониторинг за интрогрессией генетического материала, что очень важно для понимания характеристик отобранных селекционных форм. Дифференциальная окраска хромосом растений, в основном, С-бэндинг, является широко используемым методом идентификации индивидуальных хромосом. Метод нашел широкое применение на зерновых культурах, у которых хорошо выявляется четкая картина исчерченности хромосом. Однако этот метод не подходит для видов с маленьким размером хромосом, как например, видов семейств *Solanaceae* и *Brassicaceae*. Но и на видах с крупными хромосомами, например, у луковых метод не позволяет различать хромосомы родителей из-за бедности картины дифференциального окрашивания. С-бэндинг у луковых представляет собой в основном небольшие теломерные бэнды.

Геномная *in situ* гибридизация (GISH) позволяет четко различать родительские хромосомы в межвидовом гибриде. Метод основан на визуализации в хромосомах последовательностей ДНК, различающихся у родителей. В процессе дивергенции видов в их геномах происходили многочисленные изменения, которые чаще накапливались в повторяющихся последовательностях ДНК. Вследствие этого у близкородственных видов, характеризующихся высоким уровнем гомологии ДНК,

сформировались видоспецифичные семейства повторяющейся ДНК, которые разбросаны по всему геному. Используя меченную геномную ДНК одного родителя и немеченую геномную ДНК другого родителя для блокирования гомологичных последовательностей ДНК у родителей, можно получить флуоресцирующий сигнал, позволяющий различать хромосомы родителей в межвидовом гибриде. Вкратце, метод заключается в следующем: 1) выделение тотальной геномной ДНК из растений родителей; 2) мечение геномной ДНК одного из родителей флуорохромом и использование немеченой геномной ДНК другого родителя для блокирования гомологичных последовательностей ДНК на хромосомах обоих родителей; 3) приготовление цитологических препаратов хромосом межвидового гибрида; 4) денатурация ДНК-пробы (меченная ДНК+ блок ДНК) и ДНК хромосом путем нагревания для получения одноцепочечной ДНК; 5) Ренатурация ДНК и образование двуцепочечной ДНК по принципу комплементарное™; 6) детекция меченной ДНК, которая гибридизовалась с комплементарными последовательностями ДНК хромосом.

GISH анализ межвидовых гибридов Solanaceae

Картофель (*Solanum tuberosum* L., $2n = 4x = 48$) имеет более 200 диких близкородственных видов. Большинство из этих видов скрещиваются с культурным картофелем (Jackson & Hanneman, 1999). *Solanum etuberosum* ($2n = 2x = 24$), не образующий клубней дикий вид, обладает высокой устойчивостью к Y вирусу картофеля (PVY), X вирусу картофеля (PVX), вирусу скручивания листьев картофеля (PRLV) и морозостойкостью (Hanneman & Vamberg, 1986). Однако этот вид плохо скрещивается с культурным картофелем (*S. tuberosum*) из-за различий в балансовом числе эн-

досперма (Johnston & Hanneman, 1982). С целью введения ценных генов от *Solanum etuberosum* в культурный картофель были созданы соматические гибриды между *S. etuberosum* и гаплоидным клоном *S. tuberosum* ($2n = 2x = 24$). Возможность идентификации хромосом *S. etuberosum* явилась критическим моментом для успешного мониторинга интрогрессии хромосом или сегментов хромосом, несущих гены устойчивости к вирусам в культурный картофель. Проблему идентификации генетического материала сначала решали методами молекулярного маркирования, а именно RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Однако, имея только 2-3 RFLP пробы на каждую из 12 хромосом *S. etuberosum* [54], нельзя было судить о наличии целой хромосомы или ее сегмента. Огромное количество маркеров, которые представляют разные регионы хромосом, нужно было бы создать, чтобы проанализировать всю хромосому. Более того, наличие маркера не дает представление о копийности, т.е. присутствию в геноме одной или двух хромосом, несущих маркер. Также отсутствие маркера может быть результатом делеции, а не потери всей хромосомы. Наконец, информация о хромосомах дикяря, полученная при анализе маркеров *S. etuberosum*, не дает представления об изменениях в хромосомах культурного картофеля. Известно, что при тетрасомном наследовании и высокой гетерогенности картофеля интерпретация результатов, основанных только на контроле за хромосомами *S. etuberosum*, может быть сильно затруднена [51].

Успешное применение GISH для идентификации хромосом родителей у видов с мелкими хромосомами было убедительно доказано на описанных выше соматических гибридах между *S. tuberosum* и *S. etuberosum* в группе проф. Джанг Университета Висконсин-Мадисон [14]. Авторы показали отсутствие одной из двух гомологичных

хромосом у соматических гибридов, что невозможно было установить с помощью RFLP. В беккроссах, полученных при опылении соматических гибридов пыльцой тетраполидной *S. tuberosum*, GISH анализ выявил 12 хромосом *S. etuberosum* и 36 хромосом *S. tuberosum*, что свидетельствовало о преимущественном спаривании и независимом расщеплении *S. etuberosum* хромосом в соматическом гибриде. В беккроссах второго поколения авторы наблюдали отклонение числа хромосом *S. etuberosum* от ожидаемого, что указывало на то, что хромосомы *S. etuberosum* конъюгируют с хромосомами культурного картофеля. Хотя с помощью GISH не было детектировано ни одной рекомбинации или транслокации, что еще раз подтверждало ограниченность конъюгации хромосом между этими двумя видами. Но не исключалось также, что сегмент *S. etuberosum*, встроенный в хромосому картофеля в результате кроссинговера, оказался настолько маленьким, что не мог быть выявлен с помощью GISH. Подтверждением этому могут быть результаты RFLP анализа, где было показано отсутствие маркера TG68 у соматических гибридов. В то время как GISH анализ этого же гибрида не выявил потерю хромосом. Данная работа ярко демонстрирует важность сочетания молекулярного маркирования и молекулярно-цитогенетических исследований, которые дополняют друг друга и дают полную картину событий в геноме селекционных форм. Помимо того, что GISH имеет ограничения в чувствительности, этим методом нельзя идентифицировать индивидуальные хромосомы. Особенно этот недостаток становится критическим для видов с мелкими хромосомами и почти одинаковым с размером хромосом с невыраженной морфологией. Наличие молекулярных маркеров, связанных с индивидуальными хромосомами, прекрасно дополняет анализ гибридов.

GISH анализ гибридов Allium, полученных путем скрещивания 3 видов

Лук репчатый (*Allium cepa* L., $2n = 2x = 16$) является одним из самых древних культивируемых видов. Человек начал выращивать и использовать лук в пищу более 5000 лет тому назад [36]. В течение длительной истории культивирования и селекции предковый вид *A. cepa* был утерян и вместе с ним также утеряны многочисленные ценные признаки. Дикие близкородственные виды могут быть использованы как доноры хозяйственно-ценных признаков в селекции лука. Лук батун (*A. fistulosum* L., $2n = 2x = 16$) является богатым источником генов устойчивости к болезням и вредителям, например, устойчивости к увяданию листьев (*Botrytis squamosa*) [12], розовой гнили (*Pyrenochaeta terrestris*) [53], к антракнозу (*Colletotrichum gloeosporioides*) [21] и луковой мухе (*Delia antiqua*) [13]. Первая попытка перенести гены от *A. fistulosum* в геном *A. cepa* была сделана Эмвеллером и Джонсом еще в 1935 г. [16]. Однако авторы столкнулись с непреодолимым препятствием — стерильностью в беккроссируемых поколениях. Все дальнейшие попытки преодолеть барьер стерильности не увенчались успехом. В 1990 г. Ван дер Меер и Де Фриз [63] и ранее в 1982 г. МакКоллум [50] сообщали, что близкородственный вид *A. roylei* ($2n = 2x = 16$) хорошо скрещивается с *A. cepa* и *A. fistulosum*. Это наблюдение навело на мысль использовать *A. roylei* как промежуточный вид между донором генов устойчивости *A. fistulosum* и реципиентом *A. cepa*. Более того было показано, что *A. roylei* содержит ген устойчивости к мучнистой росе (*Peronospora destructor*) [44]. Хрусталева и Кик [39] разработали уникальный метод многоцветной GISH, позволяющий идентифицировать все 3 генома в межвидовом гибриде [*A. cepa* x (*A. fistulosum* x *A. roylei*)]. С помо-

щью многоцветной GISH было показано, что межвидовой гибрид содержит геномы 3 видов (рис. 1А). GISH также позволил визуализировать места рекомбинаций на хромосомах опылителя, межвидового гибрида (*A. fistulosum* x *A. roylei*), что является важным при отборе форм для дальнейшей селекции. Только спустя 65 лет после первой попытки перенести гены от *A. fistulosum* к *A. cepa* в 2000 г. выходит работа, в которой мы сообщаем о стабильной интрогрессии генетического материала *A. fistulosum* в геном лука репчатого [40]. Мы получили фертильные растения

во 2-м беккроссе от скрещивания *A. cepa* с межвидовым гибридом: *A. cepa* x x [*A. cepa* x [*A. fistulosum* x *A. roylei*]]. GISH анализ четко показал наличие *A. fistulosum* ДНК в хромосомах лука репчатого (рис. 1В).

GISH технология нашла широкое применение в межвидовой селекции. О том, насколько популярен этот метод, можно судить по десяткам и даже сотням публикаций, выходящим ежегодно. В табл. 1 собраны выборочные публикации по использованию GISH в селекции полевых, овощных и декоративных культур.

Т а б л и ц а 1

Использование GISH для анализа межвидовых гибридов

Культура	Задача селекции	Авторы
Картофель (<i>Solanum tuberosum</i>)	Анализ соматических гибридов с <i>S. nigrum</i> , <i>S. etuberosum</i> , <i>S. brevidens</i>	[28, 14, 20]
Лук репчатый (<i>Allium cepa</i> L.)	Мониторинг интрогрессии генов устойчивости от <i>A. fistulosum</i> и <i>A. roylei</i>	[39, 40]
Лилия (<i>Lilium longiflorum</i>)	Анализ образования 2n-гамет при скрещивании с Asiatic и Oriental гибридами	[38]
Пшеница (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Мониторинг интрогрессии гербицидоустойчивых генов от <i>Aegilops cylindrica</i> Host. Мониторинг гена устойчивости к листовой ржавчине <i>Lr38</i> от <i>Agropyron intermedium</i> Идентификация А и Д геномов при скрещивании с <i>Aegilops cylindrica</i> Host.	[17, 64 65]
Рис (<i>Oryza sativa</i>)	Мониторинг интрогрессии генов устойчивости от <i>O. eichingeri</i> RFLP+GISH анализ моносомик дополненных линий с <i>O. officinalis</i>	[62,68]
Папс (<i>Brassica napus</i>)	Мониторинг гена устойчивости к нематоду от <i>Raphanus sativus</i> и устойчивости от <i>Sinapis arvensis</i>	[60]
Рожь (<i>Secale cereale</i>)	Анализ гибрида с <i>Triticum aestivum</i>	[52]
Трава газонная (<i>Milium montianum</i>)	Доказательство аллополиплоидной природы, идентификация L- хромосом геномной ДНК <i>M. vernale</i>	[9]
Томат (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Мониторинг интрогрессии от <i>Solanum lycopersicoides</i> и <i>sitiens</i> Анализ соматических гибридов с картофелем и моносомик дополненных линий	[25, 27, 32]
Ячмень (<i>Hordeum vulgare</i>)	Анализ частоты рекомбинаций при скрещивании с <i>H. bulbosum</i> Мониторинг интрогрессии генов устойчивости от <i>H. bulbosum</i>	[56, 69]

Интегрирование рекомбинационной и физической карт

Интегрирование генетических рекомбинационных карт с физической структурой хромосом является важным и интригующим объектом фундаментальной и прикладной науки с момента, когда было установлено, что гены находятся на хромосоме и, причем, в определенном фиксированном порядке [10, 61]. Генетические рекомбинационные карты снабжают селекционера информацией о принадлежности признаков/генов к одной группе сцепления и их порядке расположения внутри группы сцепления. При составлении генетических рекомбинационных карт генетическая дистанция между маркерами/признаками определяется процентом рекомбинаций между ними и выражается в сантиморганах (сМ). Однако эти карты не отражают реальную дистанцию между маркерами. Известно, что рекомбинации неравномерно распределены вдоль физической хромосомы. События кроссинговера супрессированы в гетерохроматине и в районе центромеры [6, 8]. Близко расположенные маркеры на рекомбинационной карте в местах супрессии рекомбинаций могут быть физически значительно удалены друг от друга. Почему важно знать реальную дистанцию между маркерами? Что это дает для селекционера? Во-первых, это обеспечит эффективный поиск маркеров, тесно связанных с признаком/геном. Если маркер находится на значительном расстоянии от селектируемого гена, то в процессе скрещиваний есть вероятность рекомбинации между геном и маркером. При таком сценарии использование маркера становится бессмысленным и даже вредным, так как могут быть отобраны формы для дальнейшей селекции, у которых утрачен селектируемый ген. Во-вторых, это позволит клонирование важных генов и изолирование генов, чей продукт неизвестен, но фенотипический признак имеет важное экономическое значение. В свою очередь клонированный ген мож-

но будет использовать во-первых, для создания молекулярных маркеров и во-вторых, для трансформации с целью получения *cis*-генных растений [59].

Для создания интегрированных карт используются многочисленные подходы. Наиболее используемый метод — это локализация маркера относительно хромосомных нарушений, таких как делеции, инверсии и транслокации. Этот подход был успешно применен на пшенице. Интегрированная карта всех 21 хромосом была создана с использованием 436 линий с делециями [22, 23, 57, 58]. Однако метод не может быть использован у диплоидных видов, так как диплоидные организмы с крупными делециями нежизнеспособны. Кюнзел и соавторы [46] преодолели эту проблему и создали интегрированную карту ячменя, используя линии с транслокациями. Другой подход в создании интегрированных карт основан на прямом картировании в хромосомах ВАС-клонов (*Bacterial artificial chromosome*), несущих большие вставки геномной ДНК (120—150 тыс. пар нуклеотидов) и связывании их положения на хромосоме и рекомбинационной карте. Интегрированная карта *Medic ad o truncatula* была получена с помощью флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) ВАС-клонов на пахитенных хромосомах [45]. Такой же метод FISH ВАС-клонов на пахитене был использован при конструировании интегрированной карты риса [11]. Этот подход в основном применяют у видов с небольшим геномом, но он менее подходит для видов с крупными геномами, содержащими огромное количество повторяющейся ДНК. Кинг и соавторы [43] предложили использовать GISH для интегрирования рекомбинационных и физических карт. Авторы создали 16 моносомно замещенных линий *Lolium perenne* / *Festuca pratensis*. С помощью GISH они визуализировали точки рекомбинаций и связали их с AFLP рекомбинационной картой. Хрусталева и соавторы [42] также применили GISH и AFLP для конструирования интегрированной карты, но предложили совер-

шенно новую стратегию для создания картируемой популяции. Авторы использовали межвидовой гибрид *A. cepa* x (*A. fistulosum* x *A. roylei*), который представляет собой идеальный материал для картирования, так как в каждой паре хромосом одна гомеологичная хромосома принадлежит межвидовому гибриду между *A. roylei* и *A. fistulosum*, и места рекомбинаций могут быть визуализированы с помощью GISH (рис. 1С). Благодаря такому подходу были построены интегрированные карты сразу для 2 видов *A. roylei* и *A. fistulosum* [42]. Метод имеет ряд преимуществ:

1) относительно быстрый и простой способ создания картируемой популяции; 2) четкая и надежная визуализация мест рекомбинаций; 3) низкая стоимость, так как не требует информации о ДНК сиквенсах и построения ВАС библиотеки.

Интегрирование рекомбинационных и физических карт показало, что соотношения генетической дистанции, выраженной в сантиморганах, и физической дистанции, выраженной в парах нуклеотидов, значительно варьирует в различных районах генома внутри вида (табл. 2).

Таблица 2

Варьирование соотношения генетической и физической дистанций вдоль физической хромосомы

Культура	Районы с высокой частотой рекомбинаций, тыс. п. н/сМ (kb/cM)	Центромерный район, тыс. п. н/сМ (kb/cM)	Авторы
Кукуруза (<i>Zea mays</i>)	14	2 000	[15]
Лук-батун (<i>Allium fistulosum</i>)	140	22 000	[42]
Пшеница (<i>Triticum durum</i>)	118	22 000	[22, 23]
Рис (<i>Oryza sativa</i>)	120	1000	[47]
Ячмень (<i>Hordeum vulgare</i>)	100	4 000	[46]

FISH картирование генов и повторяющихся последовательностей ДНК: значение для селекционных работ

FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация) метод стал одним из самых широко используемых методов физического картирования растений. FISH метод быстрый и относительно недорогой по сравнению с другими методами физического картирования. FISH технологии, основанные на использовании митотических и мейотических хромосом, интерфазных ядер, синаптонемного комплекса и растянуто¹⁾ ДНК, были разработаны и успешно применены на растениях [7, 18, 31, 33, 34, 41, 49, 55, 67, 70]. FISH метод отличается от описанного выше GISH метода тем, что для FISH в качестве пробы используют не тотальную геномную ДНК, а отдельные ее составляющие - уникальные или повторяющиеся последовательности ДНК. Видоспеци-

фичные tandemно повторяющиеся последовательности ДНК, гибридизованные на соматических метафазных хромосомах, являются превосходными физическими маркерами для идентификации индивидуальных хромосом. Камстра и сотрудники [37] использовали этот прием для мониторинга интродукции на межвидовых гибридах *Alstroemeria*. Авторам удалось выделить видоспецифичные повторы — A001-I и D32-13 у *Alstroemeria aurea* — чилийского вида, содержащего огромное количество гетерохроматина. У бразильского вида *Alstroemeria inodora* практически отсутствует гетерохроматин. Гибридизация A001-I и D32-13 с хромосомами гибрида между *Alstroemeria aurea* и *Alstroemeria inodora* позволила четко различать индивидуальные хромосомы *Alstroemeria aurea* по характерному рисунку на хромосомах при гибридизации ДНК-проб.

Картирование генов важно для идентификации не только индивидуальных

хромосом, но и отдельных сегментов. К сожалению, чувствительность FISH метода ограничена и для растительных хромосом составляет 10 тыс. п.н., в то время как размеры генов могут колебаться от 1 тыс. до 5 тыс. п.н., т.е. ниже порога чувствительности метода. Одним из путей улучшения детекции коротких последовательностей ДНК на хромосоме обычным FISH методом стало увеличение размера детектируемой области с помощью крупных вставок геномной ДНК в бактериальные или дрожжевые искусственные хромосомы (BACs и YACs, соответственно). В BACs и YACs можно клонировать последовательности ДНК размером до 150 тыс. п.н. Физическое картирование уникальных последовательностей ДНК с помощью FISH- BACs и -YACs было успешно проведено на рисе [33], хлопке [27], ячмене [48], сорго [24], томате и картофеле [19] и т.д. Для иллюстрации важности и преимущества FISH-BAC остановимся на работе Цонг и соавторов [71], выполненной на томате. *Mi-1* ген устойчивости к корневой нематоды томата был локализован на генетической карте на длинном плече хромосомы 6, так как близко сцеплен с маркерами *Aps-1* (Acid phosphatase 1) и *yv* (yellow virescent). Используя *Mi*-BAC и *Aps*-YAC клоны в качестве проб в FISH эксперименте, авторы показали, что *Mi* ген расположен в коротком плече хромосомы 6, а *Aps-1* маркер находится в перичентромерном гетерохроматине длинного плеча хромосомы 6. На генетической карте дистанция между *Mi* геном и *Aps-1* маркером составила 1 сМ, а на самом деле ген и маркер были удалены друг от друга по меньшей мере на 40 млн п.н.

Как было сказано выше, использование FISH-BAC затруднено у видов с крупными геномами, содержащими огромное количество повторяющихся последовательностей ДНК. Использование Cot-1, -100 фракций для блокирования повторов не всегда успешно. Вероятность того, что в BAC-клоне при создании BAC библиотеки окажет-

ся повторяющаяся последовательность ДНК очень высока и избавиться от фона при детекции сигнала на хромосоме не всегда удается даже при использовании Cot-1, -100 фракций. EST-клоны (expressed sequence tag) не содержат повторов и представляют собой исключительно последовательности ДНК-генов, так как их получают на основе мРНК. Однако размер EST-клонов приблизительно варьирует от 1 тыс. до 2,5 тыс. п.н., другими словами лежит за пределом чувствительности FISH метода. В 2001 г. Хрусталева и Кик [41] разработали на растениях высокочувствительный FISH метод, основанный на усилении сигнала с помощью фенольного соединения — тирамида. Чувствительность предложенного метода, названного Tyramide-FISH, более чем в 100 раз превышает чувствительность обычного FISH. С помощью Tyramide-FISH авторы детектировали 710 п.н. (интрон *uidA* гена в T-ДНК-вставке) на митотических хромосомах трансгенного лука-шалота (рис. 1D). Метод был успешно применен авторами для картирования EST-клонов на хромосомах лука (рис. 1E).

Значительное усиление чувствительности и разрешающей способности FISH метода было достигнуто при использовании растянутой ДНК растений [18]. ДНК фибриллы освобождаются после разрушения ядерного матрикса и становятся доступными для гибридизации и детекции с помощью обычного FISH. Степень растяжения составляет приблизительно 3,27 тыс. п.н. на 1 мкм, что только на 28% выше, чем 2,97 тыс. п.н. на 1 мкм, значения нативного дуплекса В-формы ДНК, находящегося в эукариотической клетке. Так как растянутая ДНК напрямую отражает линейное расположение ДНК-последовательностей, метод используют для составления контигов, т.е. выстраивания в порядок клонов, анализа их перекрывания и определения расстояния между ними. Метод применяют, в основном, в фундаментальных исследованиях, связанных с

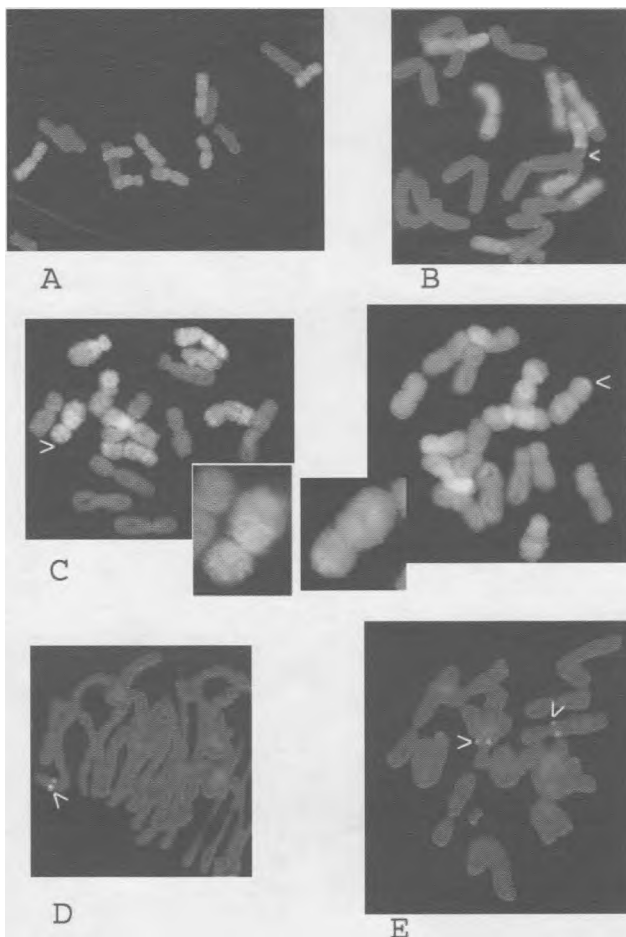


Рис. 1. Использование GISH/FISH в селекции лука. **1А.** Многоцветный GISH митотических хромосом первого поколения тригибрида *A. cepa* x (*A. fistulosum* x *A. roylei*), *A. fistulosum* (Биотин-Су3) - красная флуоресценция, *A. roylei* (FITC) - зеленая флуоресценция, *A. cepa* (блок-ДНК, DAPI)- голубая флуоресценция[39]; **1В.** Многоцветный GISH митотических хромосом второго поколения тригибрида *A. cepa* x [*A. cepa* x (*A. fistulosum* x *A. roylei*)], *A. fistulosum* (Биотин-Су3) - красная флуоресценция, *A. roylei* (FITC) - зеленая флуоресценция, *A. cepa* (блок-ДНК, DAPI) - голубая флуоресценция, стрелкой указана на хромосома, несущая в каждом плече генетический материал от трех видов [40]; **1С.** GISH визуализация мест рекомбинаций на 8 хромосоме в популяции тригибрида *A. cepa* x (*A. fistulosum* x *A. roylei*), *A. fistulosum* (Биотин-Су3) - красная флуоресценция, *A. roylei* (FITC) - зеленая флуоресценция, представлены метафазы двух индивидуальных растений, стрелки указывают на рекомбинантную хромосому 8, которая выделена из каждой метафазы в увеличенном виде: слева - рекомбинация в интерстициальном районе длинного плеча, справа - рекомбинация в дистальном районе короткого плеча [42]; **1D.** Tyramide-FISH визуализация 710 п.н. интрона *uidA* гена на прометафазе трансгенного лука-шалота, стрелка указывает на двойной красный флуоресцирующий сигнал[41]; **1E.** Tyramide-FISH картирование 1,2 тыс. п.н. EST-клона на митотических хромосомах *A. cepa* , стрелки указывают на двойной красный флуоресцирующий сигнал на обоих гомологах хромосомы 6.

изучением молекулярной организации хромосом, и также в анализе трансгенных растений. Волтере и соавторы [66] использовали FISH на растянутой ДНК для анализа копийности и организации Т-ДНК-вставки у трансгенного картофеля. Используя в качестве пробы различные участки Т-ДНК-вставки, с большей точностью можно определить состав и организацию сложного локуса, чем при использовании Саузерн блоттинга (Southern blotting). Однако этим методом нельзя идентифицировать хромосомы, так как их морфология теряется при разрушении ядерного матрикса, гистоновых и негистоновых белков, упаковывающих ДНК в хромосому.

В заключение хотелось бы надеяться, что изложенный в данном обзоре материал поможет селекционерам ориентироваться в современных возможностях молекулярной цитогенетики и успешно применять, в зависимости от задач селекции, внушительный арсенал молекулярно-цитогенетических методов при создании новых конкурентоспособных сортов культурных растений, удовлетворяющих запросы рынка и приспособленных к быстрым изменениям климата на нашей планете.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпеченко Г. Д. Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* L. x *Brassica oleracea* L. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 1927, 17 (3): 305-410. — 2. Карпеченко Г. Д., Сорокина О. Н. Гибриды *Aegilops triuncialis* L. с рожью. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 1929, 20: 563-584. — 3. Карпеченко Г. Д. Теория отдаленной гибридизации. В кн.: Теоретические основы селекции растений. М.-Л., 1935а. 398—434. — 4. Карпеченко Г. Д. Экспериментальная полиплоидия и гаплоидия. В кн.: Теоретические основы селекции растений. М.-Л., 1935б. 512-538. — 5. Карпеченко Г. Д. Увеличение скрещиваемости вида путем удвоения числа хромосом. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 1937, 2 (6): 37-56. — 6. Akhu-

nov E.D., A.W. Goodyear, S. Geng et al. // Genome res, 2003, 13: 753-763. — 7. Albini S.M., Schwarzacher T. // Genome, 1992, 35: 551-559. — 8. Anderson L.K., Doyle G.G., Brigham B. et al. // Genetics, 2003, 165: 849-865. — 9. Bennett S.T. Kenton A.Y., Bennett M. D. // Chromosoma. 1992. 101: 420-424. — 10. Bridges C.B. // Genetics, 1916, 1: 1-52. — 11. Cheng Z., Presting G.G., Buell C.R. et al. // Genetics, 2001, 157: 1749-1757. — 12. Currah L., Maude R.B. // Ann Appl Biol, 1984, 105: 277-283. — 13. De Ponti O.M.B., Inggamer H. In: van der Meer Q.P. (ed) Proc 3rd Eucarpia *Allium* Symp. PUDOC wageningen, The Netherlands, 1984, pp 21-23. — 14. Dong F., Novy R.G., Helgeson J.P., Jiang J. // Genome, 1999, 42: 987-992. — 15. Dooner H.K. // Genetics, 1986, 113: 1021-1036. — 16. Emsweller S.L., Jones H.A. // Hilgardia, 1935, 9: 265-273. — 17. Francz P.F., Alonso-Bianco C., Liharska T.B. et al. // Plant J., 1996, 3: 421-30. — 18. Friebe B., Jiang J., Gill B.S., Dycck P. L. // Theor Appl Genet, 1993, 81: 146-149. — 19. Fuchs J., Kloos D-U., Ganai M.V., Schubert I. // Chromosome Res, 1996, 4: 277 — 281. — 20. Gavrilenko T., Larkka J., Pehu E., Rokka V.M. // Genome, 2002, 45: 442-449. — 21. Galvan G.A., Wietsma W.A. Putrase-medja S. et al. // Euphytica, 1997, 95: 173-178. — 22. GtfZ K.S., Gill B.S., Endo T.R., Boyko E.V. // Genetics, 1996a, 143: 1001-1012. — 23. Gill K.S., Gill B.S., Endo T.R., Taylor T. // Genetics, 1996b, 144: 1883-1891. — 24. Gomez M.I., M. Nuru Islam-Faridi, S.S. Woo et al. // Genome, 1997, 40: 475-478. — 25. Haider Ali S.N., Ramanana M.S., Jacobsen E., Visser R.G.F. // Theor Appl Genet, 2001, 103: 687-695. — 26. Hanneman R.E., Jr. & J.B. Bamberg. Inventory of tuberbearing *Solanum* species. Bulletin 533, Research Division, College of Agriculture and Life Sciences, The University of Wisconsin-Madison, Wis., 1986, 216 pp. — 27. Hanson R.E., Zwick M.S., Choi S. et al. Genome, 1995, 38: 646 — 651. — 28. Horsman K., Gavrilenko T., Bergervoet M. // Plant Breeding, 2001, 120: 201-209. — 29. Jacobsen, E.; De Jong JH; Kamstra // Heredity, 1995, 74: 250-257. — 30. Jackson S.A., R.E. Hanneman // Euphytica, 1999, 109: 51-67. — 31. Jackson S.A., Dong F., Jiang J. // Plant J., 1999, 17:

- 581-572. — 32. *Ji Y., Pertuz U R., Chetelat R.* // Chromosome Res, 2004, 12: 107-116. — 33. *Jiang J., Gill G.L., Wang B.S. et al.* // Prpc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 4487-4491. — 34. *Jiang J., Hulbert S.H., Gill B.S., Ward D.C.* // Gen.Genet., 1996, 252:497-502. — 35. *Johnstan S.A., Jr. R.E.* // Science (Washington, D.C.), 1982, 217: 446-448. — 36. *Jones R.N.* // Cytogenetic of crop plants. MacMillan, New York, 1983, pp 516-554. — 37. *Kamstra S.A., Kuipers A.G., de Jeu M.J.* // Genome, 1997, 40: 652-658. — 38. *Karlov G.I., Khrustaleva L.I., Lim K.B., J.M. van Tuyl* // Genome, 1999, 42: 681-686. — 39. *Khrustaleva L.I., Kik C.* // Theor Appl Genet, 1998, 96: 8-14. — 40. *Khrustaleva L.I., Kik C.* // Theor Appl Genet, 2000, 100: 17-26. — 41. *Khrustaleva L.I., Kik C.* //Plant J., 2001, 25: 699-707. — 42. *Khrustaleva L.I., de Melo P.E., A.W. van Heusden, Kik C.* // Genetics, 2005, 169: 1673-1685. — 43. *King J., Armstead I.P., Donnison I.S. et al.* // Genetics, 2002, 161: 315-324. — 44. *Kotoef A., Kik C., Wietsma W.A., J.N. de Vries* // Plant Breed, 1990, 105:144-149. — 45. *Kulikova O., Gualtiere G., Geurts R. et al.* // Plant J., 2001, 27: 49-58. — 46. *Kunzel G., Korzun L., Meister A.* // Genetics, 2000, 154: 397-412. — 47. *Kurata N., Nagamura Y., Yamamoto K. et al.* // Genet., 1994, 8: 365-372. — 48. *Lapitan N.L.V., Brown S.E., Kennard W. et al.* // Plant J., 1997, 11: 149-156. — 49. *Leitch I.J., Leitch A.R., Heslop-Harrison J.S.* // Genome, 1991, 34: 928-932. — 50. *McCollum G.D.* // Bot Gaz, 1982, 143: 238-242. — 51. *McGrath J.M., Wielgus S.M., Helgeson J.P.* // Genetics, 1996, 142: 1335-1348. — 52. *Miller T.E., Reader S.M.,yPurdieK.A., King I.P.* // Theor Appl Genet, 1994, 89: 255-258. — 53. *Netzer D., Rdbinowich H.D., Weintal Ch.* // Euphytica, 1985, 34: 385-391. — 54. *Novy R.G., Helgeson J.P.* // Theor. Appl. Genet., 1994, 89: 775-782. — 55. *Peterson D.G., Lapitan N.L.V., Stack S.M.* // Genetics, 1999, 152: 427-439. — 56. *Pickering R.A., Malyshev S., Kbnzel G. et al.* // Theor Appl Genet, 2000, 100: 27-31. — 57. *SandhuD., Gill K.S.* //Plant Mol.Biol., 2002, 48: 791-804. — 58. *Sandhu D., Champoux J.A., Bondareva S.N., Gill K.S.* // Genetics, 2001, 157: 1735-1747. — 59. *Schouten H.J., Krens F.A., Jacobsen E.* // EMBO, 2006, 7 (8) 753-755. — 60. *Snowdon R.J., Kùblez A., Kùblez W., Friedt W.* // Proceeding of 10-th International raperseeds congress, Canberra, Australia, 1999. — 61. *Sutton W.S.* The chromosomes in heredity // Biol. Bull., 1903, 4: 231-248. — 62. *Tan G, Jin H., Li^l G. et al.* // Theor Appl Genet., 2005, 111: 1585-1595. — 63. *Van der Meer Q.P., De Vries J.N.* // Euphytica, 1990, 47: 29-31. — 64. *Wang Z.N., Hang A., Hansen J. et al.* // Genome, 2000, 43: 1038-1044. — 65. *Wang Z., Zemetra R.S., Hansen J. et al.* // Crop Science, 2002, 42: 939-943. — 66. *Wolters A-M, Trindade L.M., Jacobsen E., Visser R.G.* U Plant J., 1998, 13: 837-847. — 67. *Xu J., Earle E.D.* // Chromosoma, 1996, 104: 545-550. — 68. *Yan H., Liu G., Cheng Z. et al.* // Genome, 2001, 44: 86—95. — 69. *Zhang L., Pickering R., Murray B.* // Heredity, 1999, 83: 304-309. — 70. *Zhong X.B., de Jong J.H., Zabel P.* // Chromosome Res., 1996, 4: 24-28. — 71. *Zhong X.B., Bodeau J., Fransz P.F. et al.* // Theor Appl Genet, 1999, 98: 365-370.

SUMMARY

This is a review of molecular cytogenetic technology aimed at breeders and geneticists who wishes to use, or at least grasp the concepts behind, this powerful analytical tool. Genomic *in situ* hybridization (GISH) allows distinguishing parental genomes in interspecific hybrids. The principle of GISH is considered and the use of method in breeding process is illustrated. Intriguing discrepancy between genetic and physical maps is discussed. Different approaches and methods of integration of recombination and physical maps are described. Finally, physical mapping of genes using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and problems of gene mapping on plant chromosomes are discussed. A high sensitive Tyramide-FISH method is introduced, which allows to detect target DNA sequences on plant chromosome as small as 710 bp. Exploitation of Tyramide-FISH in the transgenic plant analysis and the EST (expressed sequence tag) clones mapping are described.