

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО, БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Известия ТСХА, выпуск 1, 2014 год

УДК 631.523:577.21

ФИЗИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ НА ХРОМОСОМАХ ЛУКА РЕПЧАТОГО (*ALLIUM CEPA* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ EST-КЛОНОВ И TYRAMIDE-FISH*

Д.В. РОМАНОВ, А.В. КИСЕЛЕВА, Л.И. ХРУСТАЛЕВА

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Физическое картирование генов имеет большое практическое значение. Оно позволяет идентифицировать не только индивидуальные хромосомы, но и отдельные сегменты. Результаты физического картирования могут быть использованы в селекции. Полученные знания о физическом положении генов на хромосомах позволяют прогнозировать возможности их переноса от одного генотипа к другому, определять размеры селекционной популяции, время и экономические затраты на получение нужных форм.

*Экспрессирующиеся секвенированные последовательности (EST) оказались ценным источником информации для геномных исследований. Они не содержат повторов и представляют собой исключительно кодирующие последовательности ДНК-генов, поэтому являются идеальным ресурсом для визуализации генов. Для Tyramide-FISH картирования на хромосомах *A. cepa* были взяты EST-клоны AP 166 и APPO, генетически картированные ранее в группах сцепления, соответствующих хромосоме 5 и хромосоме 1 *A. cepa* соответственно. В результате BLASTX было установлено, что AP166 кодирует транспорт азу сахарозы, а APPO кодирует светопоглощающий белок 3, являющийся частью светопоглощающего комплекса. Размер вставки EST-клонов AP166 и APPO составил 600 и 800 п.н. соответственно.*

*В результате Tyramide-FISH анализа митотических метафазных хромосом *A. cepa* было выявлено 25 сайтов гибридизации EST-клона AP166, несущего вставку гена транспорта азы сахарозы. Сигналы встречались на всех хромосомах. Ген транспортной азы сахарозы принадлежит к большому суперсемейству генов у растений с высокой гомологией ДНК внутри подсемейств и между отдельными подсемействами. Этим объясняются полученные множественные сайты гибридизации *in situ* в наших экспериментах с учетом параметров жесткости гибридизации и отмывки (80%). В результате Tyramide-FISH анализа митотических метафазных хромосом *A. cepa* был выявлен один сайт гибридизации EST-клона AP120, гомологичного светопоглощающему белку 3. Эти данные согласуются с данными генетической карты Martin *et al.* (2005), на которой положение EST-клона AP120 также показано на хромосоме 1.*

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», мероприятие 1.2.1, соглашение № 8112 от 23 июля 2013 г.

Показано, что с помощью чувствительного метода *Tvramide-FISH* можно визуализировать на высококомпактизированной растительной хромосоме короткие последовательности генов (800 п.н.), что позволяет создавать молекулярно-цитогенетические маркеры для определения индивидуальных хромосом и интегрирования генетических и физических карт.

Ключевые слова: *Allium cepa*, *Tvramide-FISH*, *EST*, гибридизация, транспортная сахароза.

Лук репчатый (*Allium cepa* L.) является второй самой важной овощной культурой, уступая лишь томату (FAO, 2013). В нашей стране его выращивают на 12% площадей открытого грунта, занятых под всеми овощными культурами [3]. Лук является важным продуктом питания человека. Химический состав луковиц и зеленых листьев включает в себя обилие полезных веществ, которые способствуют профилактике многих заболеваний [1, 8]. Необычайно огромный геном лука репчатого (1С = 16415 млн п.н.) является главной причиной, по которой задерживается создание генетических ресурсов для этого экономически и филогенетически важного растения. Геном лука в 103 раза больше генома арабидопсиса, в 34 и 6 раз больше генома риса и кукурузы соответственно [12].

Физическое картирование генов имеет большое практическое значение, поскольку позволяет определить точное местонахождение конкретного гена на хромосоме, связать физическую и генетическую карты, сделать выводы о частоте рекомбинаций на различных участках хромосом [11]. Преимуществом физических карт по сравнению с генетическими картами является то, что на физических картах можно картировать гены, расположенные в регионах с подавленной рекомбинацией, например в прицентромерных. Результаты физического картирования могут быть использованы в селекции лука. Полученные знания о физическом положении генов на хромосомах позволяют прогнозировать возможности их переноса от одного генотипа к другому, определять размеры селекционной популяции, время и экономические затраты на получение нужных форм [18].

Преимуществом физического *in situ* картирования является то, что оно позволяет получить ценную информацию о молекулярной организации генов или других последовательностей ДНК в определенных локусах индивидуальных хромосом, но при этом не требует знаний о полном сиквенсе генома. Более того, большой размер хромосом *A. cepa* и их хорошо выраженная морфология помогает при цитологических исследованиях (при идентификации хромосом и определении положения мест локализации ДНК-последовательностей).

Поиск хромосом-специфичных молекулярно-цитогенетических маркеров является одной из важных задач современной цитогенетики. Идентификация индивидуальных хромосом важна для мониторинга интрогрессии хроматина от одного вида в другой близкородственный вид в селекционных программах по межвидовой гибридизации. Физическое картирование генов позволяет идентифицировать не только индивидуальные хромосомы, но и отдельные сегменты.

С разработкой методов ДНК *in situ* гибридизации появилась возможность визуализировать интересующие последовательности ДНК на хромосомах [15]. FISH-технологии, основанные на использовании митотических и мейотических хромосом, интерфазных ядер, синаптонемного комплекса и растянутой ДНК, были разработаны и успешно применены на растениях в основном для физического картирования повторов и рибосомальной ДНК, размер которых достигает сотен тысяч п.н. [2, 21, 26].

К сожалению, чувствительность FISH-метода ограничена и для растительных хромосом составляет 10 тыс. п.н. [9]. Попытки картировать отдельные гены с использованием обычного FISH-метода, как показывают результаты многих работ, были малоэффективны, так как частота встречаемости сигнала гибридизации была крайне низкой (5-10%) [7, 16]. Это связано прежде всего с короткой протяженностью ДНК-мишени, а именно малым размером генов, который обычно составляет от 1 тыс. до 5 тыс. п.н., т.е. ниже порога чувствительности метода.

Экспрессирующиеся секвенированные последовательности (EST), секвенированные с одного конца случайно выбранные кДНК-клоны [4, 19], оказались ценным источником информации для геномных исследований [5, 27]. Они не содержат повторов и представляют собой исключительно кодирующие последовательности ДНК генов, поэтому являются идеальным ресурсом для визуализации генов. Размер EST-клонов приблизительно варьирует от 1 тыс. до 2,5 тыс. п.н., другими словами, лежит за пределом чувствительности FISH-метода. Для физического картирования таких коротких участков ДНК был разработан метод Tyramide-FISH, благодаря которому чувствительность детекции повышается в 100 раз по сравнению с существующими технологиями [10, 20, 24].

Метод Tyramide-FISH основан на ферментативном осаждении связанных с флюорохромами тирамид с помощью HRP (horseradish peroxidase). Tyramide-FISH сочетает в себе преимущества ферментного метода, основанного на осаждении многих молекул субстрата, и высокой чувствительности флуоресцентного метода. Недостатком данного метода является снижение разрешающей способности, что является следствием многократного увеличения сигнала. С помощью данного метода удалось визуализировать фрагмент ДНК размером всего лишь 710 п.н. на хромосомах лука-шалота с частотой встречаемости 36% [10].

В данной работе представлены результаты физического картирования EST-клонов на хромосомах *A. sera* с помощью Tyramide-FISH.

Материалы и методы исследования

Растительный материал и приготовление препаратов хромосом. Семена *A. sera* (2п = 2х = 16) сорта Халседон проращивали на влажной фильтровальной бумаге 72 ч при 25 °С. Потом проростки выдерживали в 0,75 мМ гидроксимочевине 24 ч при 25 °С, в воде 4 ч при 25 °С и в 0,05% колхицине (в камере с N₂O под давлением 1,0 МПа) 5 ч при 25 °С для синхронизации клеточного цикла. Затем проростки фиксировали в реактиве этиловый спирт : уксусная кислота (объемное соотношение 3:1) при комнатной температуре в течение 5 мин и оставляли на ночь при — 20 °С. Приготовление цитологических препаратов метафазных хромосом *A. sera* проводили согласно Pijnacker et al. [22] раскапыванием ферментированных кончиков корней в 100% уксусной кислоте на холодное (0 °С) препаративное стекло. После растекания каплей препараты высушивали на воздухе.

Клонирование кДНК. EST-клоны, используемые в данной работе, были получены из кДНК-библиотеки, которая была синтезирована из неизвестных тканей и клонирована в pUC-13 векторе в Native Plants, Inc. (NPI), Salt Lake City, Utah, и предоставлена Pioneer Hi-Bred Inc. (Johnston, Iowa). Восемьдесят четыре из этих клонов (обозначаются префиксом API) были использованы как RFLP-маркеры генома лука репчатого [13].

Получение ДНК-проб. Выделение плазмидной ДНК EST-клонов проводилось с использованием набора реактивов «The GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit» (Fer-

mentas, USA). Мечение плазмидной ДНК проводилось дигоксигенином методом Nick-трансляции с использованием DIG-Nick Translation Mix (Roche, Germany).

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (Tyramide-FISH). Предгибризационную обработку слайдов и гибридизацию проводили по Kuipers et al. [14] с некоторыми модификациями. Tyramide-FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация) процедура была проведена согласно Khrustaleva & Kik [10] с некоторыми модификациями (использование 0,01% HCl 8 мин вместо 0,3% H₂O₂ 30 мин для инактивации эндогенной пероксидазы).

Микроскопия и анализ изображений. Препараты хромосом были просмотрены с помощью микроскопа Zeiss Axiolmager M1, снабженного фильтрами для детекции FITC и DAPI, ультрафиолетовой лампой HBO мощностью 100 Вт, а также соединенной с компьютером цифровой камеры AxioCam. Многоканальную флуоресцентную съемку, ввод-вывод и обработку изображений по яркости/контрастности и цветовым настройкам проводили с помощью программы AxioVision v.4.6. Анализ кариотипов проводили с помощью программы Isis v.5.ru компании MetaSystems (<http://www.metasystems.su/>). Относительную позицию сайтов гибридизации меченой пробы на хромосоме рассчитывали как отношение расстояния между сайтом гибридизации и центромерой к длине плеча хромосомы, на котором был обнаружен сигнал. Морфометрию хромосом и определение положения сигнала на плечах хромосом относительно центромеры проводили с помощью программы MicroMeasure v.3.3 (<http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>).

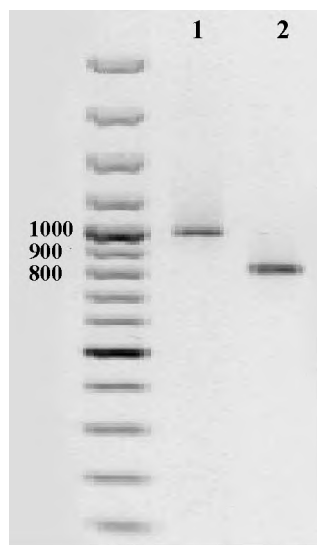


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с праймерами M13, фланкирующими вставку EST последовательности, и плазмидной ДНК EST-клонов API20 (дорожка 1) и API66 (дорожка 2). Размер полилинкера = 200 п.н.

Результаты и их обсуждение

EST-клоны для Tyramide-FISH. Для Tyramide-FISH картирования на хромосомах *A. sera* были взяты EST-клоны API66 и API20, генетически картированные ранее в группах сцепления, соответствующих хромосоме 5 и хромосоме 1 *A. sera* соответственно [17]. В результате BLASTX [6] было установлено, что API66 кодирует транспортату сахарозы, а API20 кодирует светопоглощающий белок 3, являющийся частью светопоглощающего комплекса. Размер вставки EST-клонов API66 и API20 составил 600 и 800 п.н. соответственно (рис. 1).

Картирование EST-клона с гомологией к транспортате сахарозы. EST-клон API66 из кДНК-библиотеки, полученной из тканей луковицы *A. sera*, был использован для Tyramide-FISH картирования.

Рисунок 2 иллюстрирует результаты гибридизации *in situ*. Нами были выявлены 1-3 сигнала на каждой хромосоме, что указывает на наличие в геноме нескольких участков ДНК, комплементарных пробе не менее чем на 80%, поскольку жесткость гибридизации в эксперименте была 78%, а жесткость отмывки — 80%.

В результате BLASTX-анализа было установлено, что API66 кодирует фермент, относящийся к многочисленному семейству транспортат сахарозы. На основании этого можно предположить, что сигналы на рисунке 2, ве-

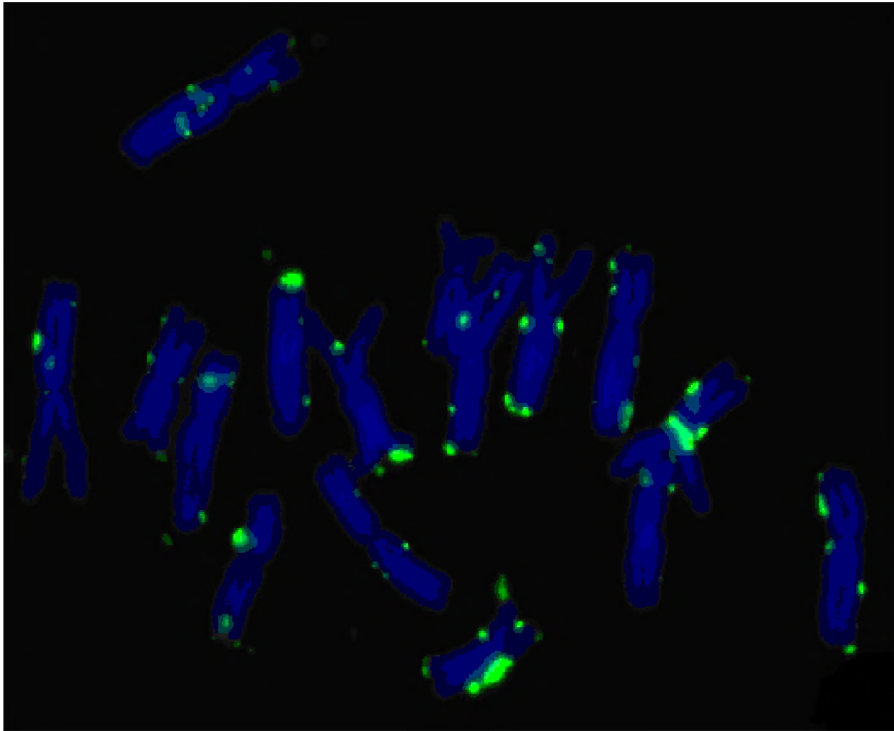


Рис. 2. Tyramide-FISH с EST-клоном API66, кодирующим транспортату сахарозы, на хромосомах *A. thaliana*. Зеленые сигналы показывают места гибридизации EST-клона API66

роятно, исходят от генов, кодирующих семейство транспортат сахарозы. Подтверждением тому являются данные об организации транспортат сахарозы у полностью отсекуенных геномов арабидопсиса и риса, у которых было показано наличие большого количества генов, кодирующих ферменты данного семейства, которые локализованы в нескольких сайтах почти на каждой хромосоме [25].

Не исключена вероятность гибридизации нашей пробы с псевдогенами — генами, с которых не происходит транскрипции. Также данные сигналы могут быть шумом, т.е. когда осаждение тирамид может происходить не в сайтах гибридизации пробы, например, из-за разрушения структуры хромосом или разрушения самих тирамид или качества препаратов и др. Для того чтобы убедиться, что полученный сигнал исходит от места гибридизации пробы на хромосоме, и отличить истинные сигналы от ложных, мы провели эксперимент в нескольких повторностях, проанализировали десятки метафаз и выполнили кариотипирование метафаз с хорошим разбросом хромосом и четкими сигналами. За истинный сигнал принимали сигнал, частота встречаемости которого была выше 30%.

Анализ положения истинных сигналов, исходящих от сайтов гибридизации EST-клона API66, на хромосоме 1 показал наличие сигнала на теломерных окончаниях обоих плеч хромосомы, в прицентромерном регионе, на коротком плече в положении $27,55\% \pm 0,78$ и на длинном плече в положении $64,07\% \pm 0,76$. Результаты анализа объединены в идиограмме (рис. 3).

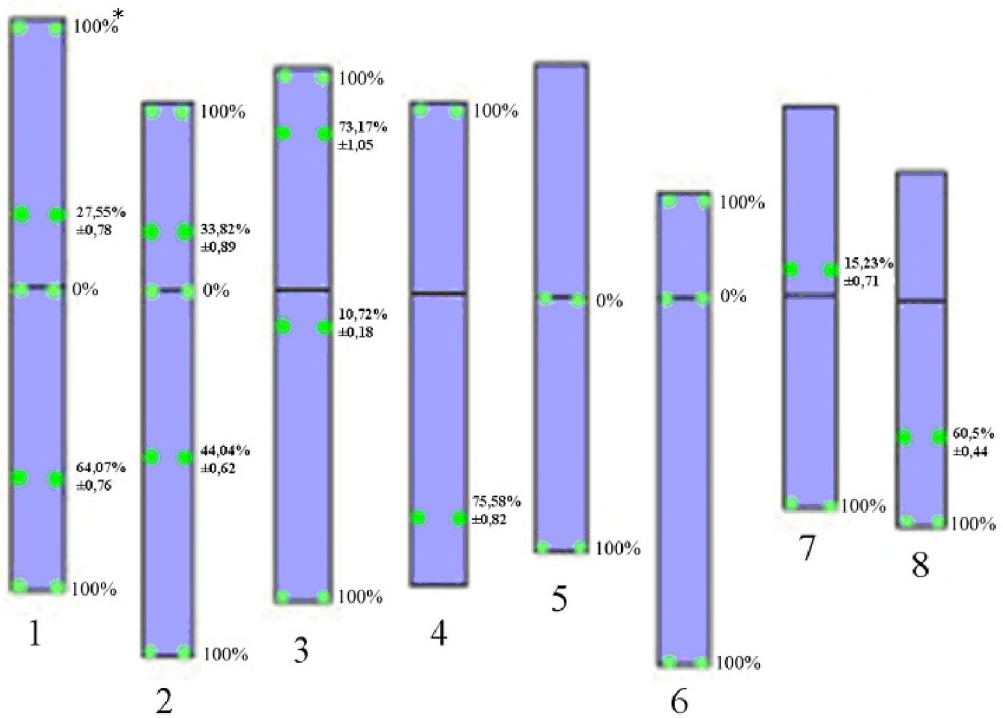


Рис. 3. Идиограмма положения сигналов гибридизации EST-клона API66, меченного диоксигенином на индивидуальных хромосомах *A. sera*. * — положение сигнала относительно центromеры в процентах от длины плеча

На хромосоме 2 сигнал выявлен на теломерных окончаниях обоих плеч хромосомы, в прицентromерном регионе, на коротком плече в положении $33,82\% \pm 0,89$ и на длинном плече в положении $44,04\% \pm 0,62$.

На хромосоме 3 сигнал выявлен на теломерных окончаниях обоих плеч хромосомы, на коротком плече в положении $73,17\% \pm 1,05$ и на длинном плече в положении $10,72\% \pm 0,18$.

На хромосоме 4 сигнал выявлен на теломерном окончании короткого плеча и на длинном плече в положении $75,58\% \pm 0,82$.

На хромосоме 5 сигнал выявлен на теломерном окончании длинного плеча и в прицентromерном регионе.

На хромосоме 6 сигнал выявлен на теломерных окончаниях обоих плеч хромосом и в прицентromерном регионе.

На хромосоме 7 сигнал выявлен на теломерном окончании длинного плеча и в коротком плече в положении $15,23\% \pm 0,71$.

На хромосоме 8 сигнал выявлен на теломерном окончании длинного плеча и на длинном плече в положении $60,5\% \pm 0,44$.

В результате Tugamide-FISH анализа митотических метафазных хромосом *A. sera* было выявлено 25 сайтов гибридизации EST-клона API66, несущего вставку гена транспоразы сахарозы. Сигналы встречались на всех хромосомах. Ген

транспортасы сахарозы принадлежит к большому суперсемейству генов у растений с высокой гомологией ДНК внутри подсемейств и между отдельными подсемействами [23]. Этим объясняются полученные множественные сайты гибридизации *in situ* в наших экспериментах с учетом параметров жесткости гибридизации и отмывки (80%).

Однако данный EST-клон был картирован на генетической карте Martin et al. [17] на хромосоме 5. Несоответствие результатов объясняется тем, что при генетическом картировании молекулярных маркеров различие в один нуклеотид позволяет картировать этот маркер. А при картировании *in situ* на физической хромосоме детектируются локусы, различающиеся до 20% своими нуклеотидными последовательностями.

Подобная организация генов, кодирующих транспортату сахарозы, показана на арабидопсисе, где установлено 24 локуса генов этого семейства на всех хромосомах, и на рисе, у которого найдено 20 локусов на всех хромосомах [25].

Картирование EST, кодирующего светопоглощающий белок 3. EST-клон API 20 из кДНК библиотеки, полученной из тканей луковицы *A. сера*, был использован для постановки Tyramide-FISH.

Рисунок 4 иллюстрирует результаты гибридизации *in situ* на хромосомах *A. сера*. Нами были выявлены сигналы от мест гибридизации с клоном API20 на первой хромосоме, что указывает на наличие в геноме участка ДНК, комплементарного пробе не менее чем на 80%, поскольку жесткость гибридизации в эксперименте была 78%, а жесткость отмывки — 80%.

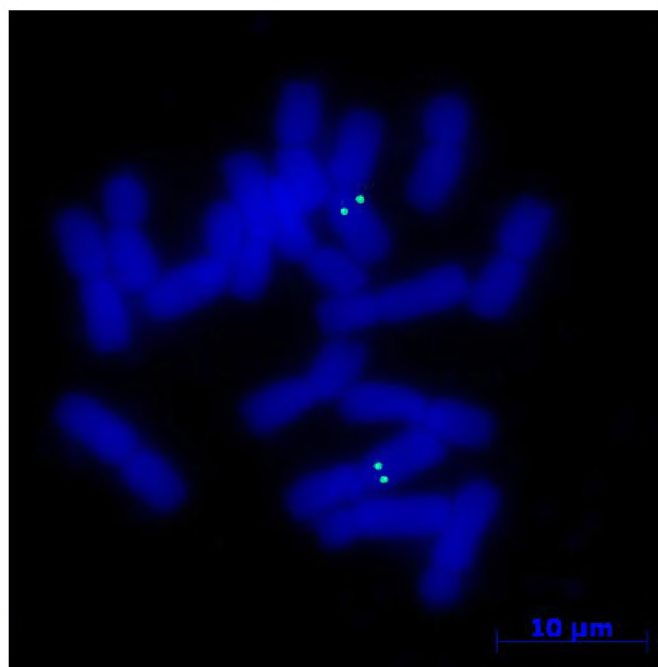


Рис. 4. Tyramide-FISH с EST-клоном API20, кодирующим светопоглощающий белок 3, на хромосомах *A. сера*. Зеленые сигналы показывают места гибридизации EST-клона API20

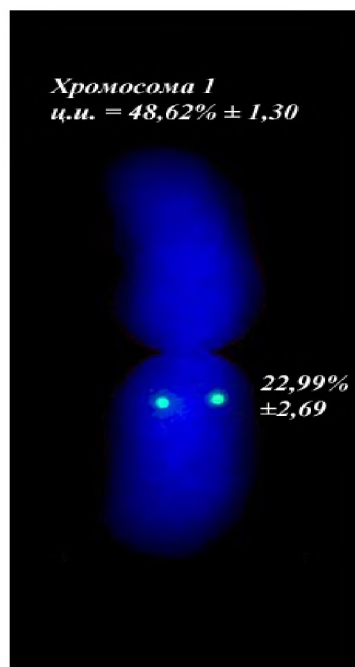


Рис. 5. Положение сигналов гибридизации EST-клона API20, меченного дигоксигенином на первой хромосоме *A. сера*

Для того чтобы убедиться, что полученный сигнал исходит от места гибридизации пробы на хромосоме, и отличить истинные сигналы от ложных, а также определить точное положение места гибридизации, было проведено кариотипирование метафаз с хорошим разбросом хромосом и четкими сигналами.

Анализ положения истинных сигналов, исходящих от сайтов гибридизации EST-клона API20, показал наличие сигнала на хромосоме 1 на длинном плече в положении $22,99\% \pm 2,69$. Результаты анализа показаны на рисунке 5.

В результате Tyramide-FISH анализа митотических метафазных хромосом *A. cerea* был выявлен один сайт гибридизации EST-клона API20, гомологичного светопоглощающему белку 3. Эти данные согласуются с данными генетической карты Martin et al. [17], на которой положение EST-клона API20 также показано на хромосоме 1.

Выводы

Показано, что с помощью чувствительного метода Tyramide-FISH можно визуализировать на высококомпактизированной растительной хромосоме короткие последовательности генов (800 п.н.), что позволяет создавать молекулярно-цитогенетические маркеры для определения индивидуальных хромосом и интегрирования генетических и физических карт.

Так, EST-клон API20 с гомологией к гену, кодирующему светопоглощающий белок 3, был картирован в проксимальной части длинного плеча ($22,99\% \pm 2,69$ от центромеры относительно длины плеча) хромосомы 1 *A. cerea*.

Установлено, что EST-клоны, принадлежащие к большим семействам сходных генов (>80% гомологии), не могут быть использованы как ориентиры для интегрирования физических и генетических карт. Картирование EST-клона API66 с гомологией к гену, кодирующему транспортеру сахарозы, выявило 25 сайтов гибридизации, распределенных по всем хромосомам *A. cerea*.

Библиографический список

1. Голубев В.Ф., Голубкина НА., Горбунов Ю.Н. Минеральный состав диких луков и их пищевая ценность // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 5. С. 602-606.
2. Киселева А.В., Киров П.В., Павленко О.С., Романов Д.В., Хрусталева Л.И. Сравнительная организация субгломерного гетерохроматина у *Allium fistulosum* L., *Allium cerea* L. ж *Allium wakegi* с использованием ВАС-FISH // Известия ТСХА. 2013. № 4. С. 23-31.
3. Кокорева В.А., Тутова П.В. Лук, чеснок и декоративные луки. М.: ЮНИОН-паблик, 2007.
4. Adams M., Kelley J., Gocayne J., Dubnick M., Polymeropoulos H., Xiao П., Merril C., Wu, Olde R., Moreno R. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project // Science. 1991. № 252. P.1651-1656.
5. Banfi S., Borsani G., Rossi E., BernardL., Guffanti A., Rubboli F., Marchitello A., Giglio S., Coluccia E., Zollo M., Zuffardi O., Ballabio A. Identification and mapping of human cDNAs homologous to *Drosophila* mutant genes through EST database searching // Nature Genet. 1996. № 13. P. 167-174.
6. Basic Local Alignment Search Tool [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
7. Gustafson J.P., Butler E., McIntyre C.L. Physical mapping of a low copy DNA sequence in rye (*Secale cereale* L.) // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1990. № 87. P. 1899-1902.

8. Imai S., Tsuge N., Tomotake M., Nagatome Y., Sawada H., Nagata T., Kumagai H. An onion enzyme that makes the eyes water // *Nature*. 2002. № 419. P. 685.
9. Jiang J., Gill B.S. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years // *Genome*. 1994. № 37. P. 717-725.
10. Khrustaleva Kik C. Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification // *Plant J*. 2001. № 25. P. 699-707.
11. Khrustaleva L., Kirov I., Romanov D., Budylin M., Lapitskava I., Kiseleva A., Fesenko I., Karlov G. The chromosome organization of genes and some types of extragenic DNA in. *11 Hum II Acta Hort*. 2012. № 969. P. 43-51.
12. King J.J., Bradeen J.M., Bark O., McCollum J.A., Havev M.J. A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome // *Theor. Appl Genet*. 1998. № 96. P. 52-62.
13. King J.J., Bradeen J.M., Havev M.J. Variability for restriction fragment-length polymorphisms (RFLP) and relationships among elite commercial inbred and virtual hybrid onion populations // *J Am Soc Hort Sci*. 1998. № 123. P. 1034-1037.
14. Kuipers G.J., Van Os D. P.M., De Jong J.H., Ramanna M.S. Molecular cytogenetics of *Alstroemeria*: identification of parental genomes in interspecific hybrids and characterization of repetitive DNA families in constitutive heterochromatin // *Chromosome Res*. 1997. № 5. P. 31-39.
15. Leitch I.J., Leitch A.R., Heslop-Harrison J.S. Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous *in situ* hybridization of two differently fluorescent probes // *Genome*. 1991. № 34. P. 928-932.
16. Ma X.F., Ross K., Gustafson J.P. Physical mapping of restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers in homoeologous groups 1 and 3 chromosomes of wheat by *in situ* hybridization // *Genome*. 2001. № 44. P. 401-412.
17. Martin W.J., McCollum J., Shigvo M., Jakse J., Kuhl J. C., Havev M.J. Genetic mapping of expressed sequences in onion and *in silico* comparisons with rice show scant colinearity // *Mol Gen Genomics*. 2005. № 274. P. 197-204.
18. Matthew V, Rockman, Sonja S., Skrovanek, Kruglvak L. Selection at Linked Sites Shapes Heritable Phenotypic Variation in *C. elegans* // *Science*. 2010. T. 330. № 6002. P. 372-376.
19. Okubo K, Hori N., Matoba R, Niivama T., Fukushima A., Kojima Y Matsubara Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression // *Nature Genet*. 1992. № 2. P. 173-179.
20. Perez R, de Bustos A., Jouve N., Cuadrado A. Localization of Rad50, a Single-Copy Gene, on Group 5 Chromosomes of Wheat, Using a FISH Protocol Employing Tyramide for Signal Amplification (Tyramide-FISH) // *Cytogenet Genome Res*. 2009. № 125. P. 321-328.
21. Peterson D.G., Lapitan N.L.V., Stack S.M. Localization of single- and low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) // *Genetics*. 1999. № 152. P. 427-439.
22. Pijnacker L.P., Ferwerda M.A. Giemsa C-banding of potato chromosomes // *Can J Genet Cytol*. 1984. № 26. P. 415-419.
23. Shiratake K. Genetics of Sucrose Transporter in Plants // *Global Science Books*. 2007. P. 73-78.
24. Stephens J.L., Brown S.E., Lapitan N.L.V., Knudson D.L. Physical mapping of barley genes using an ultrasensitive fluorescence *in situ* hybridization technique // *Genome*. 2004. № 47. P. 179-189.
25. The Map Viewer [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi
26. Xu J., Earle E.D. High resolution physical mapping of 45S (5.8S, 18S and 25S) rDNA geneloci in the tomato genome using a combination of karyotyping and FISH of pachytene chromosomes // *Chromosoma*. 1996. № 104. P. 545-550.
27. Zweiger G., Scott R.W. From expressed sequence tags to 'epigenomics': an understanding of disease processes // *Curr. Opin. Biotechnol*. 1997. № 8. P. 684-687.

PHYSICAL MAPPING OF GENES ON THE CHROMOSOMES OF ONION (*ALLIUMCEPA* L.) USING EST-CLONES AND TYRAMIDE-FISH

D.V. ROMANOV, A.V. KISELEVA, L.I. KHRUSTALEVA

(RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev)

Physical mapping of genes is of great practical importance. It allows identifying the individual chromosomes, and also individual segments. The results of physical mapping may be used in breeding programs. The knowledge about the physical location of genes on chromosomes may be used for prediction of their transfer from one genotype to another, determination of the size of breeding population and the economic costs for obtaining of desirable forms.

*Expressed sequence tags (ESTs), proved to be a valuable source of information for genomic researches. ESTs do not contain repeats and represent only coding DNA sequences of genes. So EATs are an excellent resource for genes visualization. For Tyramide-FISH mapping on *A. cepa* chromosomes were taken EST-clones API66 and API20, previously genetically mapped in the linkage groups corresponding to chromosome 5 and chromosome 1 of *A. cepa*, respectively. BLASTX established that API66 possesses insert with a high homology to the sucrose transportase gene, and API20 — to the light harvesting-like protein 3 encoding gene. The insert size of EST-clones API66 and API20 was 600 bp and 800 bp, respectively.*

*Tyramide-FISH analysis of EST-clone API66 revealed 25 hybridization sites on the mitotic metaphase chromosomes of *A. cepa*. The signals were dispersed along all chromosomes. It is known that sucrose transportase gene belongs to a large superfamily of genes in plants with high homology of DNA within and between subfamilies. This may explain the multiple sites of API66 hybridization in our experiment. In Tyramide-FISH the stringencies of hybridization and washing were 80% that allowed visualizing DNA sequences of many genes belonging to the sucrose transportase superfamily.*

EST-clone API20 showed only one site of hybridization on the long arm of chromosome 1. This data is consistent with the genetic map of Martin et al. (2005), in which ESTAPI20 belongs to linkage group assigned to chromosome 1. With Tyramide-FISH it was possible to detect target sequences on plant metaphase chromosomes as small as 800 bp. Tyramide-FISH is powerful technique for developing of molecular-cytogenetic markers that will assist the identification of individual chromosomes and the integration of genetic and physical maps.

Key words: Allium cepa, Tyramide-FISH, EST, hybridization, sucrose transportase.

Хрусталева Людмила Ивановна — д. б. н., проф. кафедры генетики и биотехнологии, гл. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 5а. Тел.: (499) 977-70-01; e-mail: khrustaleva@timacad.ru).

Романов Дмитрий Викторович — к. б. н., мл. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: (499) 977-70-01; e-mail: akabos1987@gmail.com.

Киселева Анна Витальевна — к. б. н., асс. кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: (499) 977-70-01; e-mail: sanyutabe@mail.ru.

Khrustaleva Ludmila Ivanovna — Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of genetics and biotechnology, chief researcher in the Center of molecular biotechnology RSAU - MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel.: 8 (499) 977-70-01; e-mail: khrustaleva@timacad.ru).

Romanov Dmitry Viktorovich — PhD in Biological Sciences, research associate in the Center of molecular biotechnology RSAU - MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel.: 8 (499) 977-70-01; e-mail: akabos1987@gmail.com).

Kiseleva Anna Vitalievna — PhD in Biological Sciences, assistant at the Department of genetics and biotechnology RSAU - MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel.: 8 (499) 977-70-01; e-mail: sanyutabe@mail.ru).