

УДК 575.11:576.08

СТРУКТУРА ГЕНОМА И ХРОМОСОМНЫЙ АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ

© 2013 г. Е.Д. Бадаева¹, Е.А. Салина²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, e-mail: kateinabadaeva@gmail.com;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
e-mail: salina@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 14 апреля 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

ВВЕДЕНИЕ

Термин «**геном**» впервые был введен немецким ботаником Гансом Винклером в 1920 г. для обозначения генетического материала, составляющего гаплоидный набор хромосом у растений. Гаплоидный набор хромосом обозначают как $1n$, а диплоидный – $2n$.

Хромосомный анализ растений – это комплекс методов, направленных на выявление особенностей хромосомной организации генома вида, идентификацию его хромосом, анализ их функциональной активности. История хромосомного анализа насчитывает свыше 130 лет и в настоящее время он широко используется в генетических исследованиях растений.

Митотические хромосомы первым наблюдал В. Флемминг в 1879 г., изучая деление клеток аксолотля. Немного позже (в 1882 г.) Э. Страсбургер обнаружил сходные структуры в клетках растений, а в 1881 г. Э. Бальбиани описал гигантские хромосомы из клеток слюнных желез личинок *Chironomus plumosus*. В 1883 г. Дж.Л.М. Ван Бенеден показал, что число хромосом в гаметах вдвое меньше, чем в соматических клетках, а Т. Бовери предположил (1890), что редукция числа хромосом происходит во время оогенеза. Однако для обозначения структур, появляющихся в ядре во время деления клетки, эти авторы использовали различные названия («нити», «петли», «сегменты», «элементы» и др.). Термин **хромосома** (chromo – окрашенное, soma – тело) первым применил немецкий ученый

В. Вальдейер (W. Waldeyer) в 1888 г., поскольку описанные структуры интенсивно окрашивались основными красителями.

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

Содержание ДНК на гаплоидный геном (**величина С**) является важной биологической характеристикой организма. Общее содержание ДНК в геноме принято измерять в парах нуклеотидов (п.н.), пикограммах и в дальтонах. Соотношение между этими величинами таково: $1 \text{ пкг} = 0,965 \times 10^9 \text{ п.н.} = 6,1 \times 10^{11} \text{ дальтон}$.

Изучение этого параметра выявило существенные колебания количества ДНК у значительного числа видов эукариот. Несоответствие между размерами генома и сложностью организмов, а также избыток ДНК по сравнению с ее количеством, необходимым для кодирования белков, было названо **парадоксом величины С**.

В отличие от большинства высших эукариот, растения характеризуются значительной изменчивостью размера геномов (рис. 1). Минимальный размер генома – $5,4 \times 10^7$ – был зарегистрирован у растения *Cardamine amara* семейства капустные (Brassicaceae), тогда как наиболее крупный геном $1,25 \times 10^{11}$ обнаружен у лилейного *Fritillaria assyriaca*.

Значительная изменчивость размеров генома может быть обусловлена несколькими причинами:

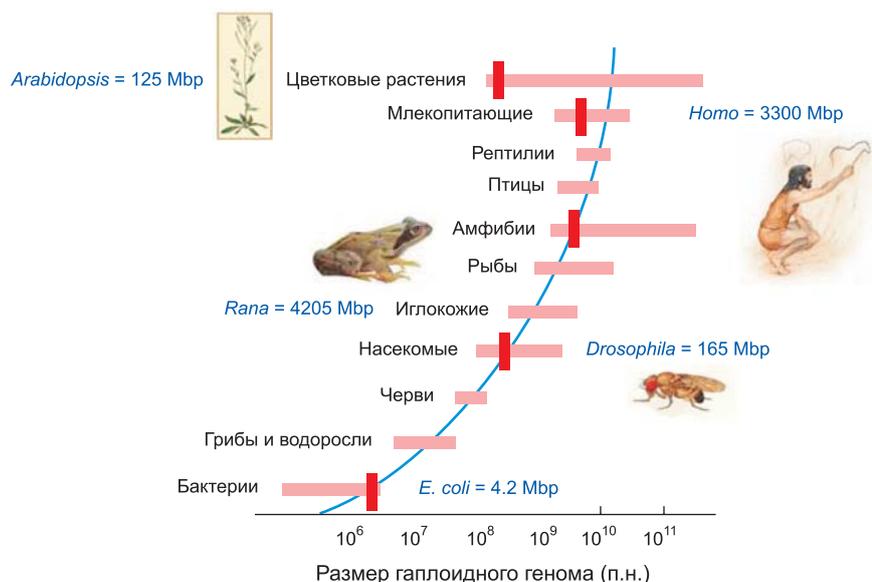


Рис. 1. Размер генома у разных групп организмов (Mbp = млн п.н.).

- 1) полиплоидией;
- 2) дупликацией/редукцией хромосом или их участков;
- 3) накоплением/удалением некодирующей, «избыточной», «ненужной», «эгоистичной» ДНК (junk) ДНК (термины, использованные в разные годы при описании парадокса С).

Определенный вклад в изменчивость генома вносят также процессы дупликации генов с их последующей инактивацией и перенос ДНК из других видов.

Полиплоидия – это кратное увеличение числа наборов хромосом. **Автополиплоиды** образуются путем кратного увеличения одного и того же генома в результате спонтанного удвоения числа хромосом или формирования нередуцированных гамет. **Аллополиплоиды** (амфиплоиды) образуются на основе объединения двух или нескольких целых геномов, принадлежащих разным видам и родам (гибридная полиплоидия). По разным оценкам от 30 до 70 % современных цветковых растений и большая часть мхов и папоротников являются полиплоидами (Meurers, Levin, 2006). К ним относятся и такие важные сельскохозяйственные культуры, как мягкая и твердая пшеница, овес, сахарный тростник и многие другие. (Источники данных по размеру геномов: М. Сингер, П. Берг. Гены и геномы, М.: Мир, 1998; Kew DNA C-values database (<http://data.kew.org/cvalues>)).

В последние годы с помощью сравнения *in silico* геномов растений, первичная структура которых в той или иной степени определена, (<http://genomeevolution.org/CoGe/>) удалось выявить многочисленные случаи «скрытой полиплоидии», или **палеополиплоидии**, у растений. Так, например, было установлено полиплоидное происхождение кукурузы, хотя геном современного вида не является истинно полиплоидным. Детальное построение генетических карт хромосом с использованием расширенного пула молекулярных маркеров показало, например, что значительная часть генома у видов *Brassica nigra*, *B. oleraceae* и *B. rapa* была дублирована в процессе эволюции. Крупные дупликации генома были выявлены у *Arabidopsis thaliana*. Доказаны случаи дупликации небольших участков генома у риса. Все эти события привели к возрастанию содержания ДНК за счет увеличения числа хромосом.

Следует отметить, что наряду с увеличением числа хромосом в процессе эволюции растений также отмечены случаи их редукции за счет теломерных слияний и инактивации одной из центромер. На цитологическом уровне это можно наблюдать с помощью гибридизации *in situ*: сигналы теломерной последовательности появляются в интерстициальных участках хромосом – внутренние теломерные районы или ITR (interstitial telomeric repeats) (рис. 2).

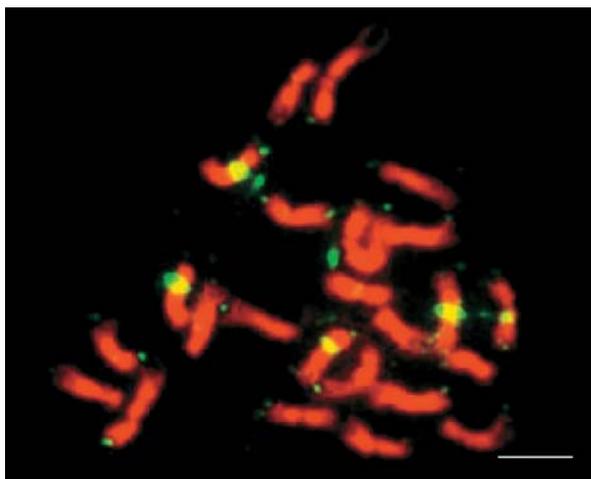


Рис. 2. Локализация теломероподобной последовательности pSbTC1 на хромосомах картофеля *Solanum bulbocastanum* методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (Tek, Jiang, 2004. P. 77–83).

По результатам секвенирования генома у *A. thaliana* было обнаружено восемь ITR длиной от 300 п.н. до 1,2 т.п.н. Три ITR располагались в центромерных, а пять – в интерстициальных

и субтеломерных участках хромосом. Их размер, однако, настолько мал, что методом *in situ* гибридизации они не выявляются.

Предполагают, что интерстициальные сайты теломерных последовательностей являются «следами» концевых слияний хромосом. Возможно, в некоторых случаях они сопровождались амплификацией теломерного повтора, приводящей к появлению ITR протяженностью до нескольких миллионов п.н. Внутрехромосомные локусы теломерной ДНК подвержены хромосомным разрывам и рекомбинациям, т. е. являются «горячими точками» хромосомных aberrаций.

Многочисленные случаи полиплоидии, включая палеоплоидию, с одной стороны, и редукция числа хромосом за счет теломерных слияний, с другой, привели к широчайшей изменчивости числа хромосом у растений. Минимальное количество хромосом $2n = 4$ найдено лишь у четырех видов, относящихся как к классу двудольных, *Brachycome dichromosomatica* (рис. 3, б) и *Haplopappus gracilis*, так и однодольных – *Zingiber beibersteiniana* и *Colpodium versicola*.

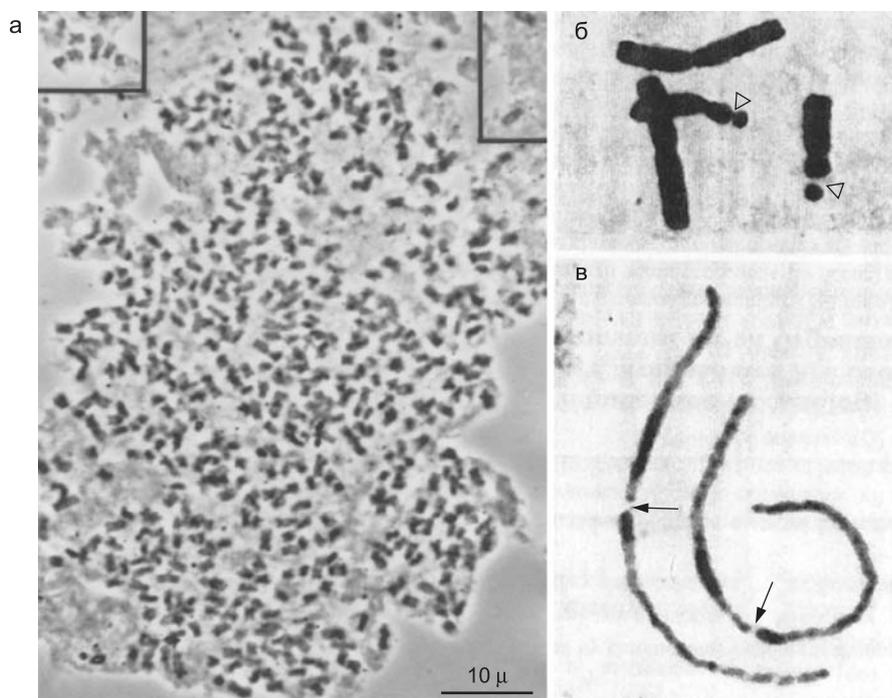


Рис. 3. Митотические хромосомы (а) субтропической пальмы *Voanioala gerardii* ($2n = 596$), б – *Brachycome dichromosomatica* ($2n = 4$) и в – муравья *Myrmecia pilosa* ($2n = 2$).

Первичная перетяжка (центромера) отмечена черной стрелкой. Вторичные перетяжки, соответствующие ядрышкообразующим районам, обозначены треугольниками (Bennett, 1998. P. 2011–2016).

Высокие числа хромосом (> 500) характеризуют мхи и папоротники. Максимальное число хромосом ($2n = 1440$) зарегистрировано у папоротника *Ophioglossum reticulatum*, у цветковых растений – у пальмы *Voanioala gerardii* ($2n = 596$) из субтропических лесов Мадагаскара (рис. 3, а). У большинства высших растений числа хромосом варьируют в пределах от 10 до 50 ($n = 5-25$). Предполагают, что виды с числом хромосом $n > 10$ являются полиплоидами.

Варьирование размера генома у растений с одинаковым числом хромосом в основном связано с количественными изменениями повторяющихся последовательностей ДНК. **Повторяющиеся последовательности (ПП)** – это последовательности ДНК, многократно повторенные в геноме. Ранее на основании анализа кинетики ренатурации ДНК их подразделяли на следующие группы:

– *Низкочастотные* повторы – последовательности, повторяющиеся десятки раз.

– *Промежуточные*, или *среднечастотные*, повторы – последовательности, повторяющиеся сотни и тысячи раз. К ним также относятся гены рРНК (у человека 200 на гаплоидный набор, у мыши – 100, у кошки – 1000, у рыб и цветковых растений – тысячи), тРНК, гены рибосомных белков и белков-гистонов.

– *Высокочастотные* повторы, число которых достигает несколько миллионов на геном. Это короткие некодирующие последовательности, которые входят в состав гетерохроматина (10–15 п.н.; 120–180 п.н.).

Позже ПП стали классифицировать не по уровню копийности, а по способу организации

в геноме. В соответствии с этим показателем выделяют два основных типа ПП: 1) тандемно организованные последовательности, представленные многократным повторением одной и той же последовательности ДНК (мономера) и 2) более сложно организованные группы последовательностей – диспергированные повторы (рис. 4).

Тандемные повторяющиеся последовательности (ПП) впервые были обнаружены во фракции сателлитной ДНК, которая отличается от остальной ДНК по плавучей плотности и может быть изолирована в виде отдельного пика при центрифугировании в градиенте плотности хлористого цезия. В зависимости от длины повторяющейся единицы (мономера), тандемные ПП относятся к микросателлитной, минисателлитной и сателлитной ДНК (Salina, 2007). Из кодирующих тандемно организованных последовательностей наиболее детально охарактеризованы гены рибосомальной РНК.

Микросателлиты – семейства коротких (1–6 п.н.) тандемно организованных повторов. Отдельные классы микросателлитов значительно отличаются по частоте встречаемости и распределению в геноме. У растений в целом преобладает микросателлит (AT)_n, а геномы двудольных растений содержат меньше GC-содержащих повторов, чем геномы однодольных. Кодирующие и некодирующие участки ДНК также отличаются по составу фракций микросателлитов.

Минисателлиты имеют длину мотива от 9 до 100 п.н., часто 15 п.н. Они образуют кластеры размером 5–30 т.п.н., расположенные преимущественно в эухроматических участках

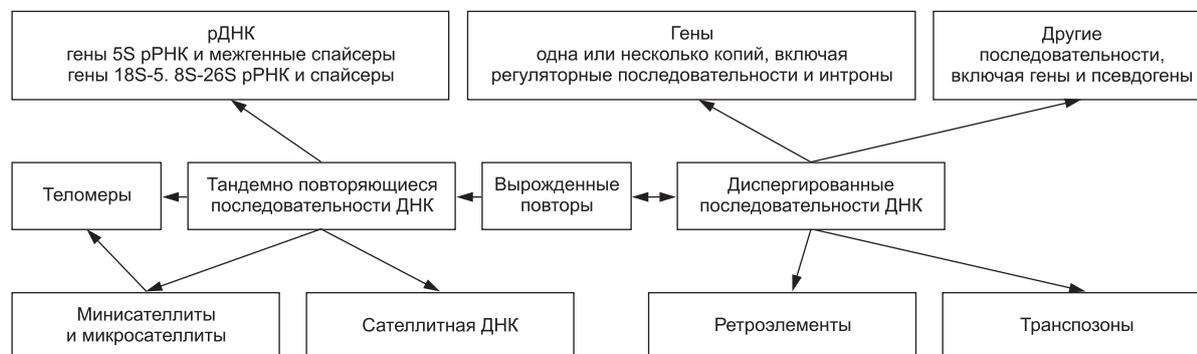


Рис. 4. Основные типы последовательностей ядерного генома растений (Schmidt, Heslop-Harrison, 1998. P. 195–199).

геномов. К классу минисателлитов относятся теломерные повторы.

Сателлитная ДНК состоит из тандемно организованных последовательностей ДНК с длиной повторяющейся единицы от ста до нескольких т.п.н. Сателлитные повторы характеризуются высоким уровнем копийности (10^5 – 10^6), образуя кластеры, содержащие до нескольких миллионов п.н. Использование сатДНК в качестве зондов при гибридизации *in situ* показало, что они располагаются в гетерохроматических районах хромосом вблизи теломерных и центромерных участков. Распространение сателлитных ДНК, как правило, ограничено одним или группой близкородственных видов. Они могут составлять до 10–20 % от общего размера генома, и нередко именно с ними связаны значительные различия в содержании ДНК у близкородственных видов. Показано также, что тандемно организованные последовательности ДНК участвуют в формировании таких функционально важных участков хромосом, как теломеры, центромеры и ядрышкообразующие районы.

Мобильные элементы (МЭ) являются неотъемлемой частью генома растений. В последние годы в связи с масштабными работами по анализу первичной структуры ДНК наиболее часто описывают мобильные элементы двух типов: элементы класса 1 (ретротранспозоны) и элементы класса 2 (ДНК-транспозоны). МЭ класса I перемещаются по геному с помощью механизма обратной транскрипции РНК-интер-

медиатов. Это обеспечивает размножение МЭ класса I путем «копирования–встраивания» и объясняет их широкую представленность в геномах растений. МЭ класса I образуют несколько порядков элементов, различающихся по структурной организации: LTR-ретротранспозоны, DIRS-элементы, Penelope, LINE (long interspersed element) и SINE (short interspersed element). LTR-ретротранспозоны, в отличие от остальных МЭ класса 1, имеют длинные терминальные повторы на концах (LTRs – long terminal repeats) и подразделяются на gypsy- и copia-подобные по аналогии с ретроэлементами, описанными у дрозофилы. Gypsy- и copia-подобные элементы различаются между собой порядком генов, расположенных между LTR. Gypsy-элементы, так же как и ретровирусы, характеризуются следующим чередованием генов, необходимых для их размножения и перемещения по геному: LTR – протеиназа (pro) – обратная транскриптаза (rt) – рибонуклеаза H (rh) – интеграна (int) – LTR. Copia-элементы содержат LTR – pro – int – rt – rh – LTR. Согласно последним данным, LTR-ретротранспозоны являются наиболее представленным субклассом МЭ в геноме растений (рис. 5).

В отличие от ретроэлементов, распространение которых включает стадию транскрипции и происходит с помощью РНК-интермедиатов, ДНК-транспозоны перемещаются с помощью механизма «вырезания–встраивания» фрагментов ДНК (подкласс 1) или посредством репликации ДНК (подкласс 2). Характерной

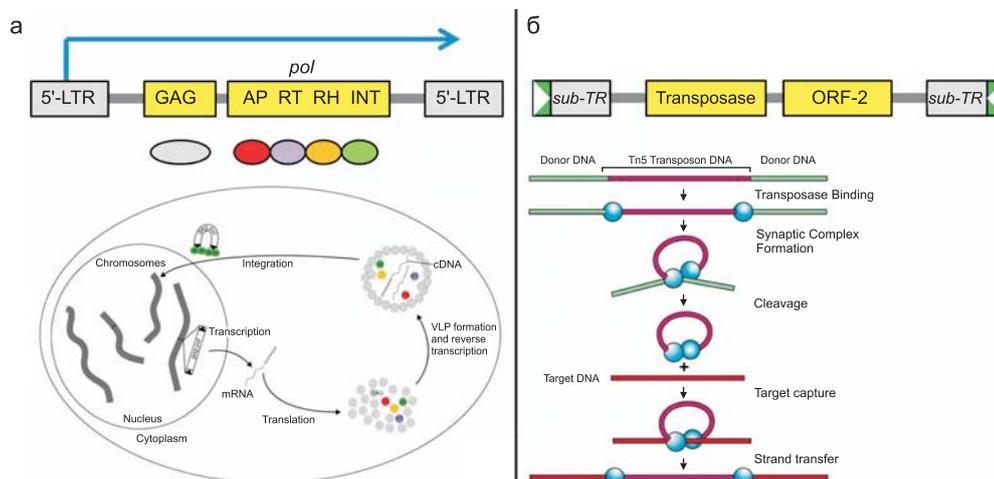


Рис. 5. Организация ретротранспозонов (а) и ДНК-транспозонов (б) (Choulet *et al.*, 2010. P. 1686–1701).

особенностью ДНК-транспозонов подкласса 1 является наличие концевых инвертированных повторов (Terminal Inverted Repeats – TIR). Транспозиция элементов первого подкласса происходит с помощью фермента транспозазы. Так, например, *Ac*-элементы кукурузы ограничены инвертированными повторами и кодируют транспозазу, которая обеспечивает их вырезание и реинтеграцию. В качестве примера подкласса 2 можно привести ДНК-транспозоны Helitron, которые описаны для генома кукурузы.

Следует отметить, что значительная часть МЭ представлена в геноме неавтономными элементами, у которых либо полностью, либо частично отсутствуют кодирующие последовательности. Неавтономные элементы способны к транспозиции только за счет активации автономными элементами соответствующего семейства генома.

Наличие среди ретротранспозонов видо-, родо-, трибо- и других специфичных для различных таксонов элементов свидетельствует о том, что инвазии ретротранспозонов происходили неоднократно в различные временные периоды (рис. 6). Обычно они перемещаются в близлежащие районы хромосом, нередко – в LTR-участки других элементов, поэтому располагаются преимущественно в бедных генами участках геномов (особенно в перицентромерных районах хромосом) (Сергеева, Салина,

2011). Помимо этого, существуют механизмы, предотвращающие встраивание или способствующие элиминации ретротранспозонов из участков генома, прилежащих к важным для организма генам.

Особенность растений в сравнении с животным состоит в значительно более высоком уровне межхромосомной гомогенизации как тандемных, так и диспергированных повторов, включая ретроэлементы. Именно этим фактом объясняют невозможность применения метода хромосомного пэинтинга (гибридизации *in situ* с использованием хромосомоспецифичной ДНК как зонда) в исследованиях растений.

Дифференциальная амплификация мобильных элементов в геномах разных видов растений лежит в основе увеличения размеров их хромосом. Так, например, размер хромосомы арабидопсиса примерно в 100 раз меньше, чем у сосны, и в 10 раз меньше, чем у свеклы. Эти различия хорошо видны и на цитологических препаратах митотических, т. е. конденсированных, хромосом (рис. 7). В целом у представителей различных таксономических групп растений длина митотической хромосомы варьирует от долей микрона (грибы и водоросли) до 20 и более μm (лилейные и голосемянные).

Информация об организации и распределении кодирующих и некодирующих последовательностей в хромосомах растений начала появ-

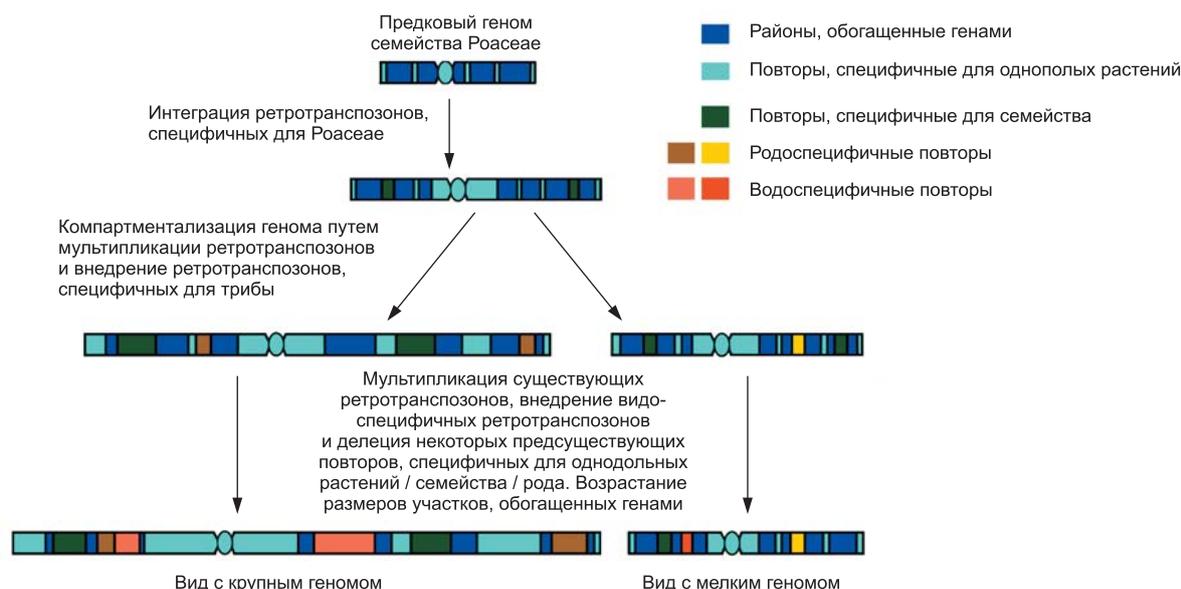


Рис. 6. Гипотетическая модель эволюции хромосом злаков (Sandhu, Gill, 2002. P. 803–811).

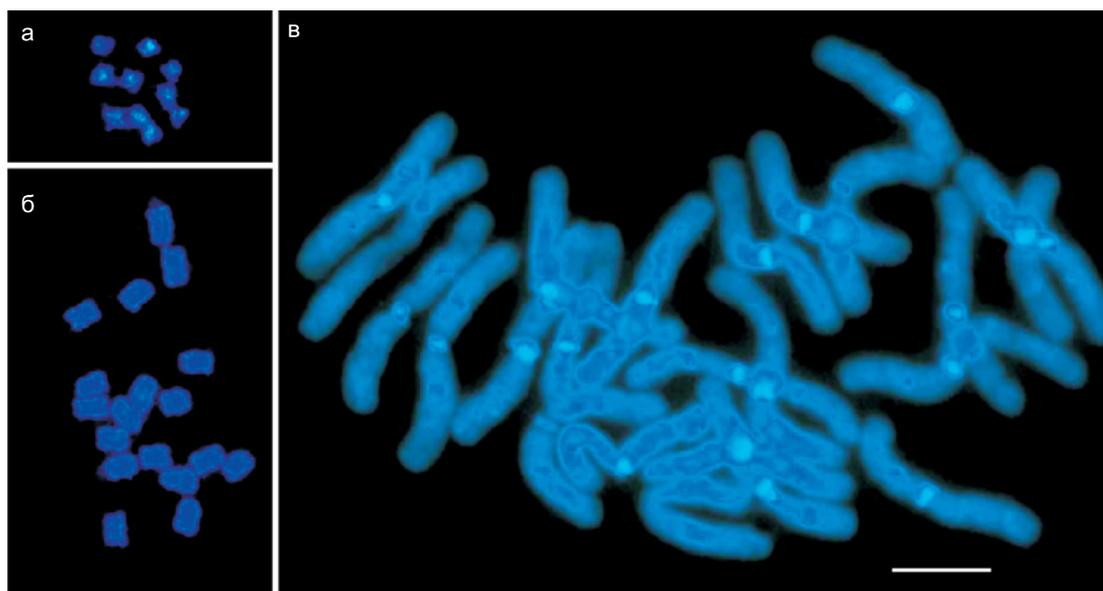


Рис. 7. Изменчивость размеров хромосом у трех диплоидных видов высших растений.

а – арабидопсис (гаплоидный геном 140 млн п.н.; $2n = 10$); б – сахарная свекла (750 млн п.н., $2n = 18$); в – сосна (23,000 млн п.н., $2n = 24$) (Schmidt, Heslop-Harrison, 1998. P. 195–199).

ляться только с начала 90-х гг. XX в. в результате прямой локализации последовательностей ДНК на хромосомы с использованием методов **физического картирования** (гибридизация *in situ* и/или молекулярно-генетический анализ делеционных линий). Впоследствии существенный вклад в понимание структурной организации хромосом был получен при секвенировании и локализации на хромосоме отдельных протяженных участков ДНК, клонированных в составе бактериальных искусственных хромосом (bacterial artificial chromosome – ВАС клоны). В соответствии с полученными результатами последовательности ДНК, соответствующие генам, образуют дискретные кластеры, чередующиеся с участками, состоящими из одного или нескольких блоков повторяющихся последовательностей с характерной организацией и положением в геноме (рис. 8). При этом плотность генов увеличивается от центromеры к дистальному участку хромосом.

У растений с мелкими геномами в связи с отсутствием кластеров тандемных повторов в интеркалярных участках хромосом плотность генов более высокая и они распределены более равномерно. У видов со средними или крупными геномами повторяющиеся последовательности образуют протяженные, непрерывные

блоки, характеризующиеся высоким уровнем метилирования и не содержащие генов. Они разделяют богатые генами (GR = gene-rich) сегменты хромосом. Протяженные блоки повторов присутствуют не только в центромерных, но и в интеркалярных участках хромосом (рис. 8).

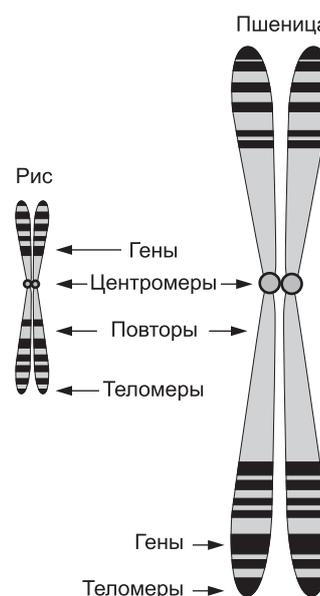


Рис. 8. Схематическое изображение метафазных хромосом риса и пшеницы со сходным содержанием и порядком генов (Moore, 2000. P. 195–222).

Локализация GR-районов на хромосомах злаков совпадает с положением участков рекомбинации, причем частоты рекомбинации в разных GR-участках могут существенно отличаться. В проксимальной трети плеча хромосомы рекомбинация полностью отсутствует, что может быть связано с приближенностью этого участка к центромере. Районы хромосом с низким содержанием генов представлены в основном ретротранспозоноподобными элементами.

КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМОСОМ

Виды растений отличаются не только по числу и размерам хромосом, но их форме, которая определяется положением **центромеры**. На наружной поверхности центромеры расположены кинетохоры, служащие местом связывания микротрубочек веретена. На митотических хромосомах выделяют также **теломеры**, защищающие концы хромосом от повреждений и выполняющие ряд других жизненно важных функций в клетке. Хромосомы большинства эукариот в норме имеют одну центромеру – **моноцентрические хромосомы**. В то же время известны виды, на хромосомах которых отсутствует четко выраженная, морфологически и физиологически дифференцированная первичная перетяжка. Такие хромосомы называются **голоцентрическими**, и они имеют **диффузную центромеру**. Среди растений голоцентрические хромосомы встречаются в основном у представителей двух родственных семейств – Juncaceae (*Luzula*) и Sурегасеае (*Rhynchospora*). Существуют также виды, хромосомные наборы которых включают как моноцентрические, так и голоцентрические хромосомы.

Помимо первичной, или центромерной, перетяжки, на некоторых хромосомах могут встречаться одна или несколько **вторичных перетяжек**. Некоторые из них функционально связаны с ядрышками – структурами ядра, ответственными за синтез рибосомной РНК. Методом гибридизации *in situ* было показано, что в них расположены кластеры генов 18S-5,8S-26S рРНК. Фрагмент плеча, отделяемый спутничной нитью от тела хромосомы, называется **спутником**, а сама хромосома – **спутничной**, или **SAT-хромосомой**.

У большинства растений все хромосомы набора представлены парами **гомологичных** хромосом. В то же время некоторые виды растений содержат пару генетически отличающихся хромосом, которые определяют развитие мужского или женского пола – **половые хромосомы**. Как правило, у женских особей присутствуют две одинаковые X-хромосомы, а у мужских особей половые хромосомы разные – X и Y, хотя существуют и другие системы детерминации пола (например, у птиц, дрозофилы и др.).

У многих видов растений, наряду с хромосомами диплоидного хромосомного набора (**А-хромосомы**), встречаются добавочные, или сверхчисленные, **В-хромосомы** (рис. 9). В отличие от хромосом основного набора, их число не постоянно – оно может отличаться у разных особей одной популяции и даже в различных клетках и тканях одного индивида. Характерной особенностью В-хромосом является то, что их присутствие не обязательно для нормальной жизнедеятельности организма. В небольшом количестве они не влияют на фенотип растений, но большое число В-хромосом отрицательно сказывается на жизнеспособности и плодовитости организма.

Совокупность морфологических признаков (включая число хромосом), по которым можно идентифицировать данный хромосомный набор, называют **кариотипом**. Этот термин предложил русский ученый Г.А. Левицкий в 1924 г. Впоследствии определение кариотипа было уточнено, и в настоящее время под ним понимают систематизированный набор хромосом

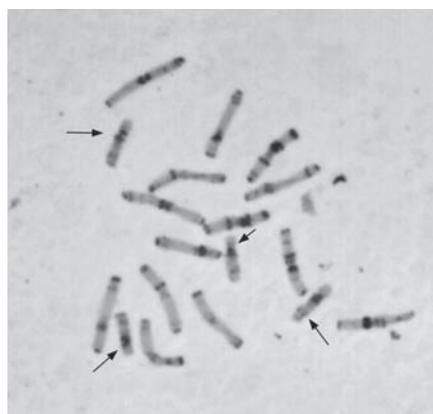


Рис. 9. Дифференциально окрашенная метафазная пластинка *Aegilops speltoides* с 4 В-хромосомами.

индивида. Графическое изображение кариотипа со всеми структурными характеристиками хромосом называется **иднограммой**.

Кариотипы составляют в соответствии с определенными правилами. В цитогенетике для этого предложены два основных подхода: цитологический и генетический. Цитологическая классификация строится на основе морфологических параметров хромосом, тогда как генетическая классификация учитывает генетическое родство хромосом разных видов.

В соответствии с принципами цитологической классификации в кариотипах сначала приводят хромосомы основного набора в порядке убывания их линейной длины, при этом SAT-хромосомы ставят последними. Половые хромосомы располагают после аутосом. В случае наличия В-хромосом их приводят после основного набора.

Генетическая номенклатура базируется на генетическом родстве (гомеологии) хромосом. Ее основы были заложены в работах американского генетика Эрни Сирса, который создал первую генетическую классификацию хромосом мягкой пшеницы. Он разделил хромосомы на семь групп генетически родственных (гомеологичных) хромосом, каждая из которых включала по три пары хромосом из А-, В- и D-геномов (рис. 10).

Впоследствии было установлено, что хромосомы других видов злаков также родственны хромосомам мягкой пшеницы и, соответственно,

могут быть отнесены к одной из семи гомеологических групп. Для определения генетического родства хромосом существует несколько тестов. Первый – компенсационный – тест основан на способности гомеологичных хромосом замещать друг друга в кариотипе гибридов. Другой подход учитывает их способность к индуцированной конъюгации в мейозе гибрида. Оба этих метода, однако, можно использовать лишь для хорошо скрещивающихся видов.

Для определения гомеологии можно использовать молекулярно-цитогенетические маркеры с консервативным положением на хромосомах. К ним, в частности, относятся локусы 5S и 45S рРНК генов, локализованные у злаков на хромосомах 1-й, 5-й и 6-й гомеологических групп в определенных позициях относительно друг друга. Консерватизм распределения локусов РНК генов показан и для других групп растений.

Наиболее надежным и точным способом определения генетического родства хромосом разных видов и родов растений является сравнительное генетическое картирование. С его помощью определяют взаимосвязи между хромосомами или их отдельными участками даже столь отдаленных видов и родов растений, как рис и пшеница, кукуруза и овес и т. д. (рис. 11).

Генетическая номенклатура хромосом более объективна и обладает рядом преимуществ по сравнению с цитологической классификацией, однако она доступна лишь для ограниченного

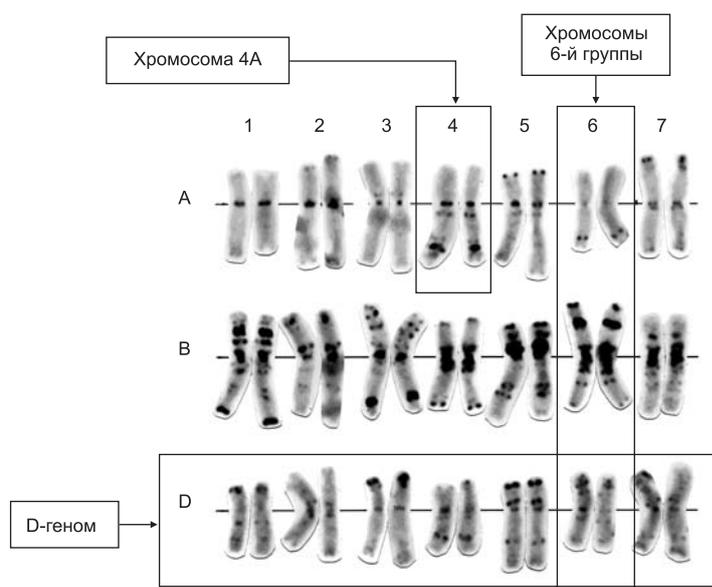


Рис. 10. Генетическая классификация хромосом мягкой пшеницы.

числа видов, поскольку требует детального знания генетики объекта и наличия достаточно насыщенных генетических карт хромосом.

Классификации хромосом видов сельскохозяйственных растений, составленные в соответствии с принципами цитологической и генетической номенклатуры, могут не совпадать. Так, например, самая мелкая хромосома ячменя по цитологической номенклатуре обозначается 5Н (две хромосомы ячменя несут спутники и им присваиваются два последних номера – 6Н и 7Н). В то же время по данным генетического картирования, она соответствует 1-й гомеологической группе пшеницы и по генетической номенклатуре обозначается 1Н.

Таким образом, растения характеризуются значительной изменчивостью размера генома, числа и морфологии хромосом. Числа хромосом варьируют в широчайших пределах – от 4 до 1000 и более, однако большинство видов

содержат от 12 до 60 хромосом на диплоидный геном. Показана прямая взаимосвязь между размером генома растения и длиной его хромосом, при этом размер хромосом не зависит от систематического положения вида. Для растений характерна также значительная изменчивость морфологии хромосом – положения центromеры, наличия, числа и локализации вторичной перетяжки. Отдельную группу составляют растения с голоцентрическими хромосомами, характеризующимися диффузной центromерой.

Накопленная информация свидетельствует о широком разнообразии кариотипов растений, которые отличаются по числу, размеру, морфологии составляющих его хромосом. Кариотип служит важным таксономическим признаком вида. В связи с широкой кариотипической изменчивостью растений классификацию хромосом при составлении кариотипов необходимо проводить в соответствии с едиными принци-

GRASS GENOMES

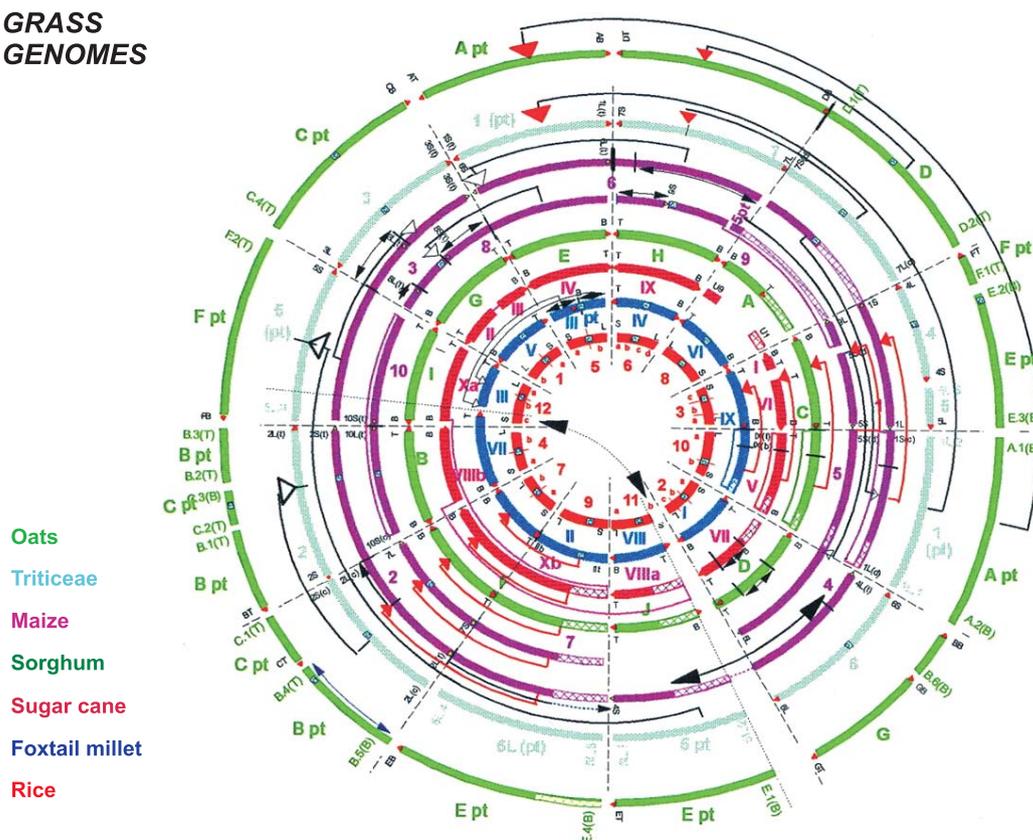


Рис. 11. Сравнительная консенсусная карта злаков. Данные для сравнения взяты из работ разных авторов по картированию геномов риса, кукурузы, овса, сорго, сахарного тростника, проса и пшеницы.

Стрелками указаны инсерции и транспозиции в хромосомах современных видов. Пунктирными стрелками отмечены районы с недостаточным числом данных для сравнения (Gale, Devos, 1998. P. 1971–1974).

пами. Для этого существуют два подхода: цитологической и генетической. Наиболее широко применяются принципы цитологической классификации, при которой хромосомы в кариотипе ранжируются по размеру. В случае если исследования проводят на видах с известной гомеологией хромосом, следуют принципам генетической номенклатуры, в соответствии с которой хромосомы классифицируют по их генетическому родству.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ХРОМОСОМ РАСТЕНИЙ

Современный хромосомный анализ – это совокупность методов и подходов, позволяющих наиболее полно охарактеризовать геном растений, выявить индивидуальные особенности каждой хромосомы для ее безошибочной идентификации, а также изучать функциональную активность хромосом и их отдельных участков на разных стадиях клеточного цикла. Высокая изменчивость растений по числу, размеру и организации хромосом, составу и распределению семейств повторяющихся ДНК обуславливает то, что методы, разработанные для анализа одних видов, могут оказаться малоинформативными или даже непригодными для изучения других видов. Например, С-бэндинг, выявляющий на хромосомах пшеницы более 100 блоков в разных позициях, мало подходит для исследования растений с мелким размером генома, поскольку они содержат С-бэнды только в прицентромерных районах хромосом и их сложно отличить друг от друга на основании этого маркера (рис. 12). С другой стороны, крупные хромосомы разных видов растений также отличаются по способности окрашиваться разными красителями из-за различий по составу фракций высокоповторяющейся ДНК. В связи с этим для каждой таксономической группы растений необходимо подбирать комплекс методов хромосомного анализа, наиболее полно выявляющих индивидуальность их геномов. В соответствии с выполняемой задачей, а также особенностями используемых методик хромосомный анализ подразделяется на:

- дифференциальное окрашивание хромосом;
- гибридизацию *in situ*;

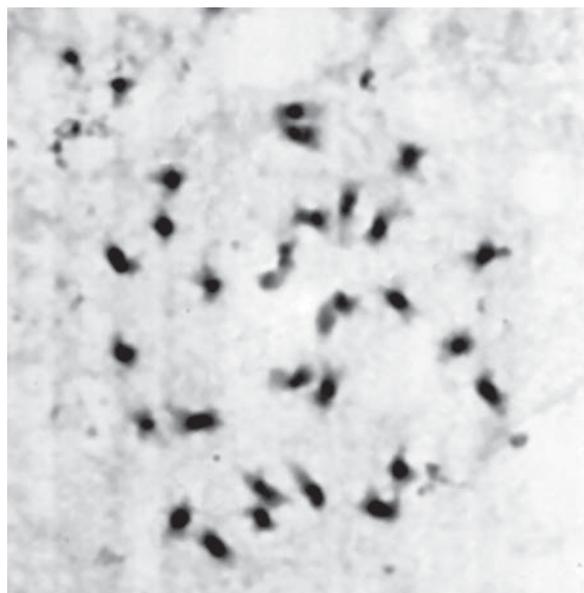


Рис. 12. С-окрашенная метафазная пластинка льна *Linum usitatissimum* (микрофотография любезно предоставлена О.В. Муравенко, ИМБ РАН).

- иммунофлюоресценцию;
- проточную флюориметрию;
- микродиссекцию.

Методы **дифференциального окрашивания** можно разделить на две подгруппы. Первая из них направлена на выявление линейной неоднородности хромосом, вторая – на изучение их функциональной активности. Первая из них включает разные варианты флюоресцентного окрашивания, С-, G- и N-бэндинг (рис. 13, а, с), вторая – серебрение, «арлекинное окрашивание» и репликативный бэндинг.

Впервые неравномерное окрашивание хромосом по длине при использовании флюоресцентного красителя акрихина и его производных было получено шведским ученым Т. Касперссоном в 1968 г., а затем и другими исследователями из разных стран мира. Дифференциальная флюоресценция выражалась как в появлении ярко флюоресцирующих бэндов в определенных участках хромосом, так и наоборот – более тусклой флюоресценции некоторых хромосомных сегментов (рис. 13, а).

Уже в первых работах было отмечено, что положение ярко флюоресцирующих участков совпадает с локализацией так называемого «холодового гетерохроматина» – недоконденсированных участков хромосом, появляющихся

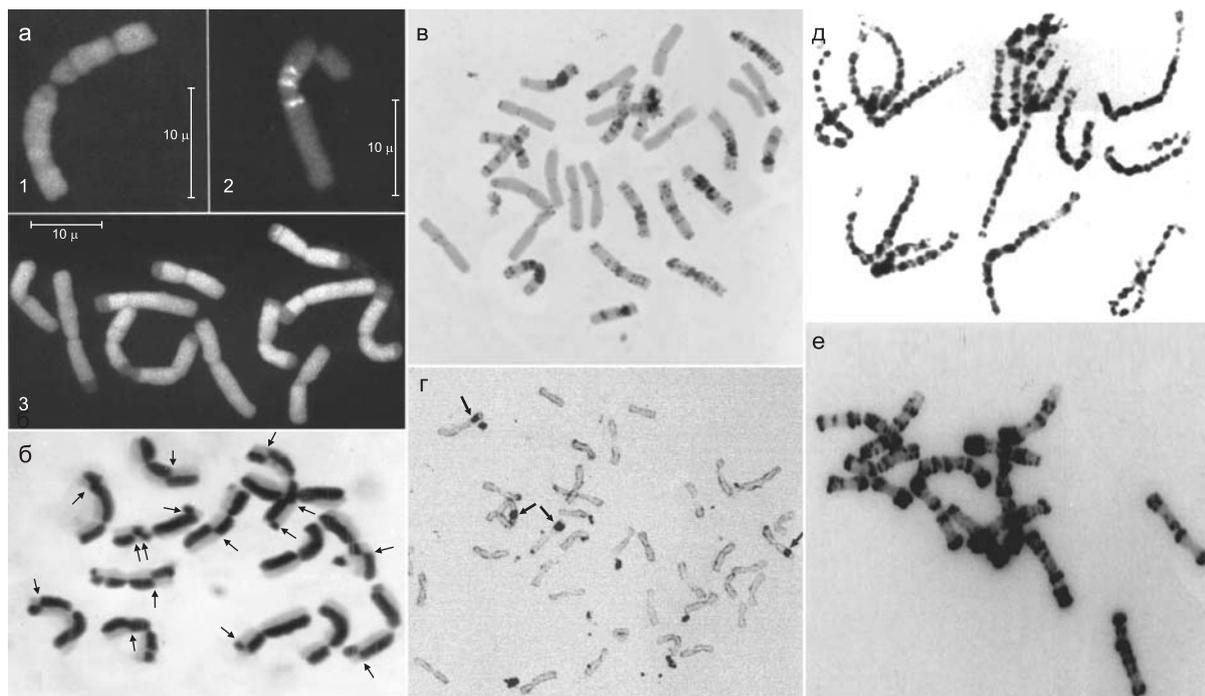


Рис. 13. Разные способы дифференциального окрашивания хромосом растений.

а – флюоресцентный бэндинг: окрашивание хромосомы М *Vicia faba* с помощью этидия бромид (1) и акрифлавина (2) и метафазная пластинка *Tulbaghia pulchella*, окрашенная акрихин-ипритом (3) (Vosa, 1970. P. 366–372); б – «арлекинное окрашивание» хромосом ржи *Secale cereale* (фотография любезно предоставлена Dr. B. Friebe, WGGR, KSU, USA); в – С-окрашивание хромосом пшеницы *Triticum araraticum*; г – Ag-NOR окрашивание хромосом пшенично-ячменного амфидиплоида (Santos *et al.*, 1984. P. 425–429); д – G-окрашивание на хромосомах лилии (Chen *et al.*, 1994. P. 79–87); е – рисунок поздней репликации на хромосомах ржи, выявленный с помощью иммуноцитохимического окрашивания антителами к бромдезоксисуридину (Kakeda, Yamagata, 1992. P. 67–70).

после холодной предобработки материала. Впоследствии было установлено, что именно в этих участках располагаются сателлитные ДНК. Дифференциальная флюоресценция сателлитных ДНК обусловлена тем, что их семейства имеют относительно однородный состав со сдвигом соотношения АТ или ГЦ пар оснований относительно основного пула ядерной ДНК данного вида. Если в семействе сатДНК, формирующем данный гетерохроматиновый район, имеется избыток АТ-оснований, то соответствующий бэнд ярко окрашивается АТ-специфичными флюоресцентными красителями (акридиновый оранжевый, DAPI, Hoechst 33258) – рис. 13, а2. ГХ блоки, образованные ГЦ-богатыми сатДНК (например, блоки приядрышкового гетерохроматина), выявляют с помощью хромомицина А₃ (СМА₃) или 7-аминоактиномицина D (AAD); при этом эти блоки тускло флюоресцируют при окрашивании DAPI (рис. 13, а3). Наиболее четкие рисунки

флюоресценции получают при использовании комбинации красителей, специфичных для АТ- и ГЦ-оснований, обычно DAPI + СМА₃.

В хромосомном анализе растений широко применяется метод С-дифференциального окрашивания, или С-бэндинг (рис. 13, в, 14). Впервые С-окрашивание было получено Pardue и Gall (1970) на хромосомах мыши, вскоре после этого – на хромосомах человека и растений. Большой вклад в разработку и совершенствование этого метода внесли работы российских ученых: А.И. Щаповой, И.А. Тихоновича, А.Б. Иорданского и его группы. Наибольшее число исследований по С-бэндингу было выполнено в 70–90 гг. XX в., а в настоящее время он используется в ряде лабораторий России, США, Японии и некоторых других стран.

Показано, что блоки, выявляемые методом С-бэндинга, располагаются в определенных позициях, индивидуальных для каждой хромосомы (рис. 14). Рисунки окрашивания гено-



Рис. 14. Дифференциально окрашенный кариотип мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг (Gill *et al.*, 1991. P. 830–839).

моспецифичны и видоспецифичны. Несмотря на то что существует несколько модификаций С-бэндинга, отличающихся друг от друга порядком и продолжительностью отдельных этапов, а также составом красителя Гимза, на хромосомах конкретного вида или сорта растений они выявляют идентичные рисунки расположения С-бэндов (рис. 14). С-бэндинг используют для изучения многих растений, но наиболее широкое применение он нашел у злаков и лилейных, имеющих крупные хромосомы с большим числом ГХ блоков.

Метод N-бэндинга исходно был создан для выявления ядрышкообразующих районов (NOR) хромосом растений и животных, однако позже было обнаружено, что он специфически окрашивает также районы конститутивного гетерохроматина. Методом гибридизации *in situ* было установлено, что положение N-бэндов на хромосомах совпадает с локализацией микросателлитной последовательности (GAA)_n. Бла-

годаря простоте и надежности метода, который позволил проводить масштабные эксперименты в сравнительно короткие промежутки времени, невысокой стоимости реактивов, совместимости обработок с процедурой гибридизации *in situ* и высокому разрешению N-бэндинг широко использовался в 70–80 гг. XX в. в различных областях цитогенетики растений. В частности, с его помощью японским генетиком Т.Р. Endo были созданы делеционные линии пшеницы, на которых базируются все современные исследования по физическому картированию хромосом этого вида.

Метод N-окрашивания пригоден для изучения лишь некоторых видов растений, так как выявляет не все типы гетерохроматина. Помимо этого, хорошие результаты получали только с помощью красителя Гимза-Banco, который в настоящее время снят с производства. В связи с этим число исследований с применением этого метода в последние годы резко сократилось.

Несмотря на то что G-окрашивание является основным методом анализа хромосом человека и животных, в исследованиях хромосом растений он практически не используется. Некоторые ученые считают, что получить G-бэндинг на растениях в принципе невозможно из-за существенных различий в организации хромосом растений и животных. Другие исследователи приводили результаты G-подобного окрашивания хромосом растений (рис. 13, д), полученного с помощью разного типа преобработок. Вторая группа методов дифференциального окрашивания направлена на изучение функциональной активности хромосом. В нее входят методы серебрения, или Ag-NOR окрашивания, «арлекинное окрашивание» и репликативный бэндинг. **Ag-NOR-окрашивание**, или серебрение, – это метод селективного окрашивания районов ядрышковых организаторов хромосом, активных в предшествующей митозу интерфазе (рис. 13, г). Метод был разработан в середине 70-х гг. XX в. для изучения хромосом млекопитающих, несколько позже он был модифицирован применительно к хромосомам растений. Показано, что серебро окрашивает не кластеры 45S рРНК генов, расположенные в ядрышкообразующих районах хромосом, но ассоциированные с ними аргентофильные белки транскрипционного аппарата: в основном UBF-

фактор связывания и РНК-полимеразу I (RPI), а также селективный фактор промотора (SL1) и ДНК-топоизомеразу I (Торол).

«**Арлекинное окрашивание**» – это метод, предназначенный для выявления сестринских хроматидных обменов (СХО) на хромосомах. Он основан на встраивании аналога тимидина – бром-дезоксисуридина (BrDU) в хромосомную ДНК на протяжении одного из двух или двух последовательных клеточных циклов. ДНК сестринских хроматид дочерних хромосом, образовавшихся после второго деления клеток, будет содержать разное число цепей, включивших BrDU, и в зависимости от этого они будут по-разному окрашиваться флюоресцентными красителями (Hoechst 33258) или красителем Гимза (рис. 13, б). Метод, разработанный в начале 70-х годов XX в. – для анализа хромосом млекопитающих и получивший название «арлекинное окрашивание», является высокочувствительным тестом на мутагенез, однако его применение сдерживает достаточно высокая трудоемкость и продолжительность, а также необходимость работы с токсичными агентами.

Возможность получения **репликативного бэндинга** на хромосомах растений долго оспаривалась многими исследователями. В то же время с помощью иммуноцитохимических методов была показана неравномерность репликации разных участков хромосом на протяжении S-фазы клеточного цикла. В частности, блоки теломерного гетерохроматина и перицентромерные районы хромосом ржи реплицировались в конце S-фазы (рис. 13, е).

Гибридизация *in situ* в настоящее время является наиболее распространенным и быстро развивающимся методом хромосомного анализа растений. Впервые как метод прямого картирования последовательностей ДНК на хромосомах ее провели в конце 1960-х–начале 1970-х гг. на животных (Pardue, Gall, 1970) и несколько позже – на растительных препаратах. В первых работах для гибридизации с цитологическими препаратами использовали РНК- или ДНК-зонды, меченные радиоактивным тритием или ^{125}I , а гибридизационные сигналы выявляли с помощью радиоавтографии (рис. 15, а).

В начале 1980-х гг. был разработан метод *in situ* гибридизации с ДНК-зондами, меченными биотином, а несколько позднее А. Райбурн и

Б. Гилл модифицировали эту методику для хромосом растений (рис. 15, б). Позднее была разработана система, основанная на использовании меченных дигоксигенином (диг-ДУТФ) нуклеотидов, выявляемых с помощью системы антител. Дигоксигенин – стероидный гаптен, выделенный из наперстянки (*Digitalis*), в природе распространен намного реже, чем биотин. В связи с этим использование *dig*-меченных зондов для гибридизации позволяет снизить уровень неспецифического связывания при детекции сигнала по сравнению с биотинилированными пробами.

Важным усовершенствованием метода *in situ* гибридизации стала разработка способов флюоресцентной детекции сигнала – Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). Преимуществом FISH перед другими методами явилась возможность локализации на одном препарате одновременно нескольких ДНК зондов (рис. 15, в–к). Использование зондов, меченных непосредственно флюорохромами, упрощает исследования, поскольку не требует детекции сигнала.

Дальнейшее развитие гибридизации *in situ* шло в разных направлениях, что привело к появлению множества модификаций метода. Бурный прогресс в этой области связан с совершенствованием микроскопической техники и молекулярно-биологических технологий, появлением систем регистрации и обработки изображений, разработкой новых методов клонирования и приготовления хромосомных препаратов растений, а также с реализацией проектов по секвенированию геномов.

В конце 1980-х–начале 1990-х гг. были опубликованы первые работы по использованию метода геномной *in situ* гибридизации – Genomic *in situ* Hybridization (GISH) – на хромосомах растений. При проведении GISH меченую геномную ДНК одного из родителей полиплоидного вида или гибрида используют как пробу, а фрагментированную геномную ДНК другого родителя или самого полиплоида добавляют в гибридизационную смесь для блокирования кросс-гибридизации. В результате в кариотипе полиплоида проявляется четкая дифференцировка между хромосомами и участками хромосом, унаследованными от разных предков (рис. 15, е).

Следует отметить, что для растений в литературе опубликована лишь одна работа, в которой

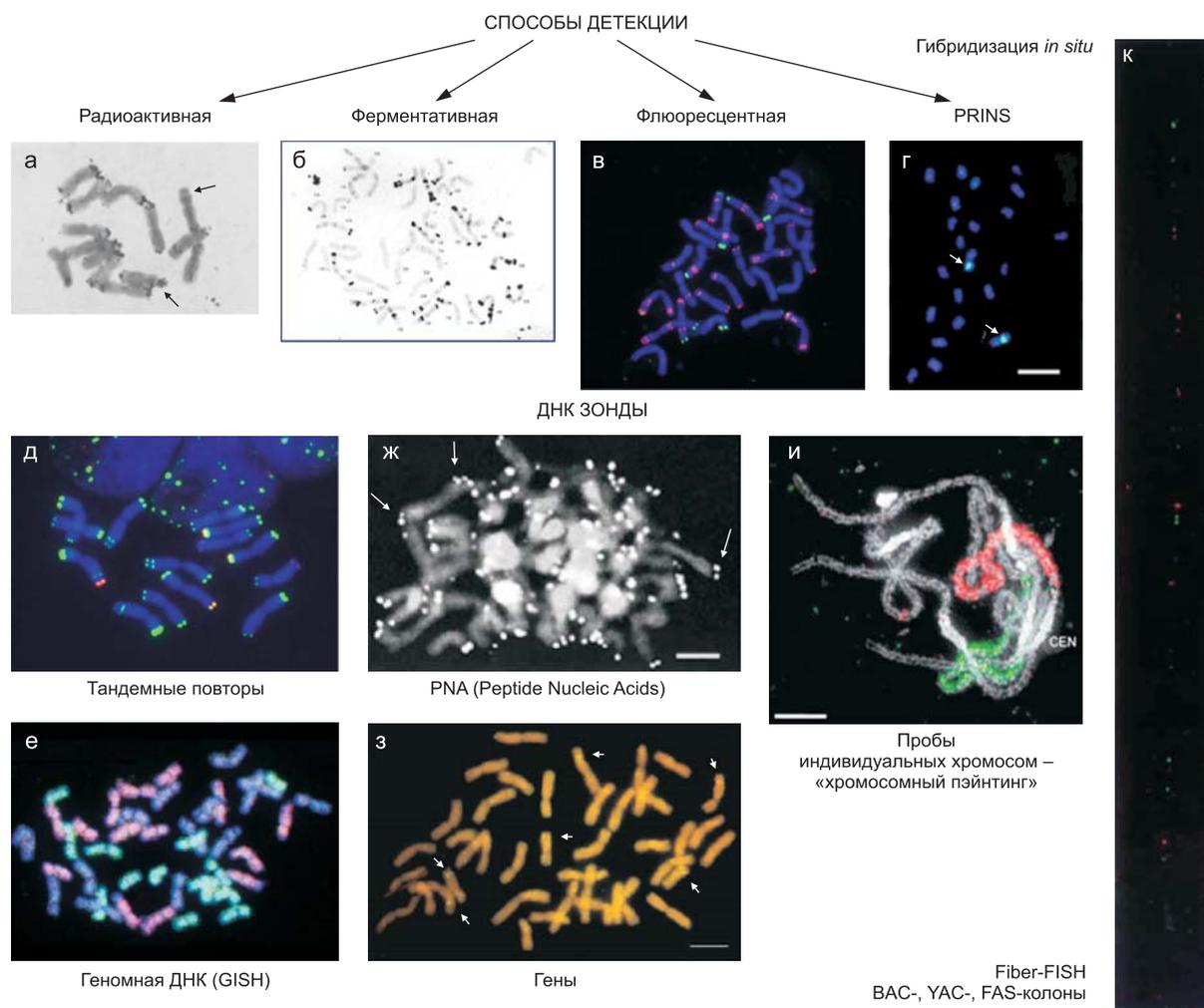


Рис. 15. Классификация методов *in situ* гибридизации.

а – гибридизация *in situ* меченной тритием кРНК, синтезированной с семейства повторов 480 bp на хромосомах ржи, выявленная с помощью радиоавтографии (время экспозиции 14 дней). Стрелками отмечены две NOR-хромосомы, гетерозиготные по размеру спутника (Jones, Flavell, 1982. P. 595–612); б – гибридизация меченной биотином последовательности рSc119 на хромосомах мягкой пшеницы сорта Sanstar (детекция с помощью пероксидазы хрена и окрашивания красителем Гимза); в – флюоресцентная гибридизация *in situ* рSc119.2 (красный) и Spelt-1 (зеленый) последовательностей на хромосомах *Triticum timopheevii* (фото С.А. Зошука, ИМБ РАН, Москва); г – цитогенетическое картирование тандемно организованного повтора MaTR1 на хромосомах банана методом C-PRINS (Hřibová *et al.*, 2007. P. 268–274); д – FISH с семействами тандемно повторяющихся ДНК рSc119.2 (зеленый) и Spelt52 (красный) на хромосомах *Aegilops longissima* (фото С.А. Зошука, ИМБ РАН, Москва); е – геномная гибридизация *in situ* (GISH) на хромосомах мягкой пшеницы с использованием геномной ДНК *T. monococtum* (красный) и *Ae. tauschii* (зеленый) в качестве зондов (фото А.В. Амосовой, ИМБ РАН, Москва); ж – метафазная пластинка *Nicotiana tabacum*, меченная TTAGGG-PNA зондом (Weiss, Scherthan, 2002. P. 155–164); з – картирование генов высокомолекулярных глютеинов на хромосомах мягкой пшеницы методом гибридизации *in situ* (Cabrera *et al.*, 2002. P. 49–54); и – «хромосомный пэинтинг» хромосомы 1 *Arabidopsis thaliana* на стадии профазы митоза с помощью 183 хромосомспецифичных BAC клонов (BAC клоны короткого плеча метили биотином и выявляли красным цветом, BAC клоны длинного плеча метили дигоксигенином и выявляли зеленым цветом (Lysak *et al.*, 2003. P. 195–204)); к – многоцветный FISH с зондами интегразы (красный) и HB17 (зеленый) на вытянутых ДНК фибриллах *Aegilops squarrosa* (Fukui *et al.*, 2001. P. 189–196).

удалось получить специфическую гибридизацию каждой из индивидуальных хромосом на препаратах хромосом арабидопсиса. Этот метод, получивший название «хромосомного пэинтинга» и основанный на использовании

хромосомспецифичных ДНК-зондов, широко используется в молекулярной цитогенетике человека и животных для исследования изменений хромосом в процессе эволюции, идентификации хромосомных перестроек и решения

многих других задач. Считается, что применение этого метода на растениях невозможно из-за избыточного содержания повторяющихся последовательностей и высокого уровня гомогенизации повторов между хромосомами.

Важным усовершенствованием метода гибридизации *in situ* стала разработка в середине 1990-х гг. системы тирамидной амплификации сигнала – Tyramide Signal Amplification (TSA). Она позволила решить одну из сложнейших проблем FISH на хромосомах растений – картирование индивидуальных генов. Суть TSA состоит в использовании тирамид, меченных флюорохромами (или биотином), как субстрата пероксидазы для переноса множества копий молекул флюорохрома (биотина) непосредственно к сайту связывания пероксидазы. Это позволяет усилить сигнал в 10–100 раз без существенного повышения фона. Сигналы можно выявлять с помощью флюоресцентного микроскопа или сразу, или после дополнительной инкубации с флюоресцентно меченым стрептавидином. С помощью этого метода стало возможным картировать на хромосомах растений ДНК-зонды размером не более 1–3 т.п.н., что примерно соответствует размеру гена. Решать подобные задачи можно также с помощью PRINS-полимеразной цепной реакции на препаратах с использованием праймеров, фланкирующих «целевой» ген (рис. 15, г).

Принципиально новым подходом к созданию зондов для FISH стала разработка пептидо-нуклеиновых кислот (Peptide Nucleic Acid = PNA) – синтетических аналогов ДНК, в которых сахаро-фосфатный остов молекулы ДНК заменен полиамидным. Они не несут электрического заряда и в связи с этим обладают более высокой чувствительностью и специфичностью в сравнении с обычными ДНК зондами. Особенности химической структуры PNA позволяют использовать более короткие зонды при гибридизации, в связи с чем их применяют в основном для изучения и количественной оценки теломерных (рис. 15, ж) и центромерных последовательностей.

Одним из важных технических достижений в области флюоресцентной гибридизации *in situ* стала разработка в 1996 г. технологии получения препаратов фибрилл хроматина путем лизиса интерфазного ядра с сохранением интактных молекул ДНК, которые с помощью достаточно

сложных манипуляций растягиваются по длине предметного стекла. Fiber-FISH используется для точной физической локализации генов и разных семейств повторяющихся последовательностей (рис. 15, к), колокализации зондов относительно друг друга, картирования трансгенов и решения многих других задач.

Современная гибридизация *in situ* представляет собой комплекс методов, отличающихся как по способу детекции сигналов, так и характеру используемых зондов и способу приготовления хромосомных препаратов (рис. 15), и направлена на решение самых разнообразных задач: идентификацию хромосом, картирование генов и других типов последовательностей, в филогенетических и многих других исследованиях.

Иммунофлюоресценция – метод хромосомного анализа, сходный с флюоресцентной гибридизацией *in situ*, но отличающийся от нее отсутствием этапа ДНК-ДНК или ДНК-РНК гибридизации на хромосомах. Иммунофлюоресценция предназначена для выявления на цитологических препаратах специфических белков, производных азотистых оснований или других биологических молекул с использованием флюоресцентно меченых антител (рис. 16). Различают прямую и непрямую иммунофлюо-

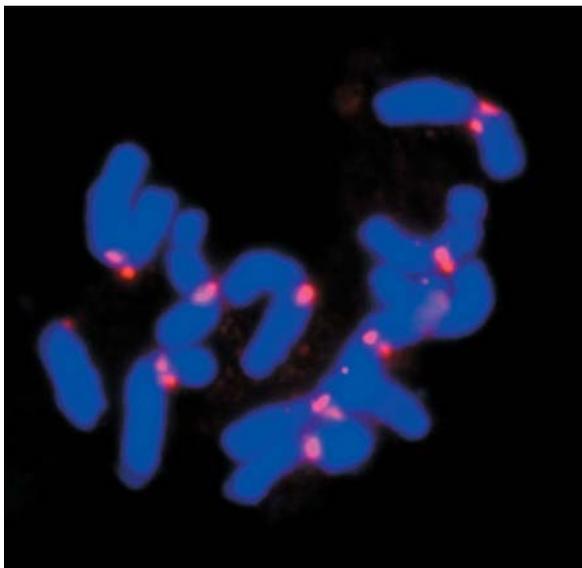


Рис. 16. Иммунофлюоресцентное окрашивание хромосом ячменя *Hordeum bulbosum* антителами к центромерно-специфичному гистону злаков CENH3 (фото любезно предоставлено Dr. Andreas Houben, ИРК, Германия).

ресценцию; в соответствии с первым методом детекцию молекул-мишеней производят с помощью первичных антител, конъюгированных с флюорохромами, во втором используют систему двойной детекции с первичными и вторичными антителами.

Проточная флюориметрия – это метод получения фракций индивидуальных хромосом посредством их сортировки по размеру (интенсивности, спектру флюоресценции или другим характеристикам) при пропускании суспензии через узкий пучок света (обычно излучаемый лазером) с определенной длиной волны. Хромосома, проходящая через луч света, рассеивает световые частицы, при этом спектр испускания окрашивающих ее молекул флюоресцентных красителей имеет большую длину волны, чем у источника света. Комбинация световых волн улавливается детекторами, которые анализируют флюктуации яркости на нескольких детекторах (каждый из которых настроен на определенный пик излучения) и выдает информацию о физической и химической структуре частиц, достаточную для их разделения (рис. 17). Для проведения проточной флюориметрии необходимо, чтобы хромосомы (или другие частицы) можно было разделить по их физическим или химическим параметрам. Для работы с растениями необходимо проводить синхронизацию клеточных делений для получения достаточно высокого митотического индекса, а также использовать эффективные процедуры лизиса растительных тканей для получения суспензии изолированных хромосом.

Проточные флюориметры были разработаны в середине 1960-х гг. и с конца 1970-х годов они начали активно использоваться в молекулярной цитогенетике человека и млекопитающих для получения фракций индивидуальных хромосом с целью создания хромосомоспецифичных ДНК-библиотек, получения проб для SKY-FISH и многих других задач. Первые работы по проточной флюориметрии хромосом растений появились лишь в середине 1980-х–начале 1990-х гг.

Важной проблемой при работе с большинством видов растений является сходство морфологических параметров хромосом. В этом случае не удается изолировать «чистые» фракции отдельных хромосом, но получают группы из нескольких сходных по размеру

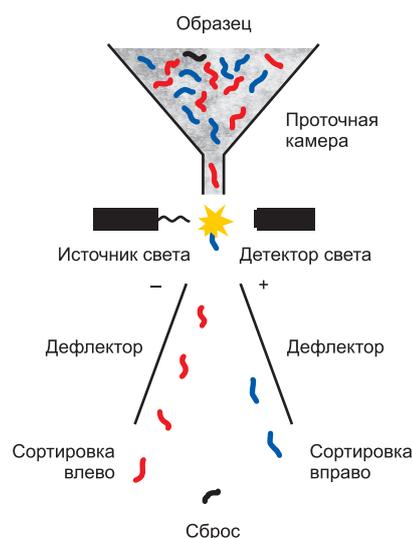


Рис. 17. Схема проточного флюориметра, разделяющего суспензию хромосом на две фракции.

хромосом (рис. 18). Для хромосомного сортирования таких культур используют делеционные или транслокационные линии, в которых «целевая» хромосома отличается от остального набора по размеру (Doležel *et al.*, 2009). В настоящее время проточная флюориметрия является одним из наиболее востребованных методов в геномике растений, поскольку на ее основе создаются хромосомоспецифичные ВАС-библиотеки, необходимые для успешного выполнения проектов по секвенированию геномов.

Микродиссекция как способ получения изолированных хромосом или их участков методом прямого «вырезания» из препаратов под микроскопом была разработана в начале 1980-х гг. для выделения и клонирования участка политенной хромосомы дрозофилы. Первые публикации по применению микродиссекции у растений вышли в начале 1990-х гг., и с тех пор этот метод применяют во многих лабораториях мира. Существуют два основных способа микродиссекции: лазерная, при которой на препаратах с помощью лазерного луча выжигают все хромосомы, кроме целевой (рис. 19), и прямое вырезание хромосом (участков хромосом) с помощью стеклянной микроиглы, присоединенной к микроманипулятору, с использованием инвертированного микроскопа (рис. 20).

Хромосомы или их фрагменты, полученные с помощью микродиссекции, собирают в

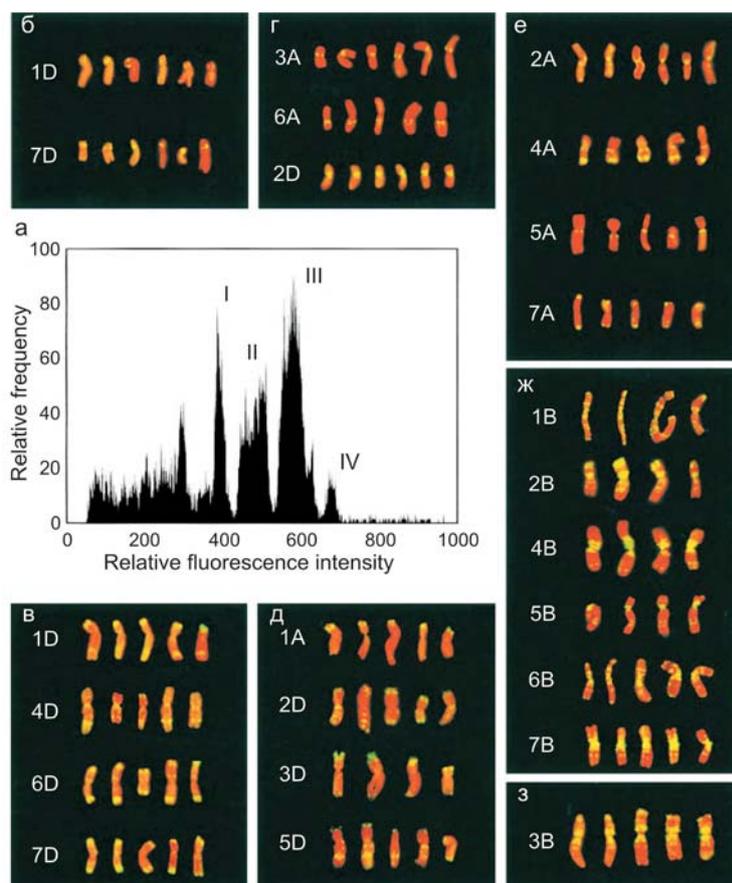


Рис. 18. «Цитофотометрический» кариотип *T. aestivum* cv. Chinese Spring (а) и изображения хромосом, выделенных из отдельных пиков.

Сортированные хромосомы идентифицировали по рисункам мечения методом C-PRINS с использованием праймеров к микросателлиту GAA (б, г, е-з) или *Afa* повтору (в, д). Хромосомы окрашены йодистым пропидием. (а) «Цитофотометрический» кариотип, полученный на окрашенных DAPI хромосомах, содержит три основных сложных пика (I, II и III), представляющих разное число типов хромосом, и хорошо выраженный пик IV, соответствующий хромосоме 3B. (б, в – хромосомы из пика I; г, д) – хромосомы из пика II; (е, ж) – хромосомы из пика III; (з) – хромосома 3B из пика IV (Vrana *et al.*, 2000. P. 2033–2041).

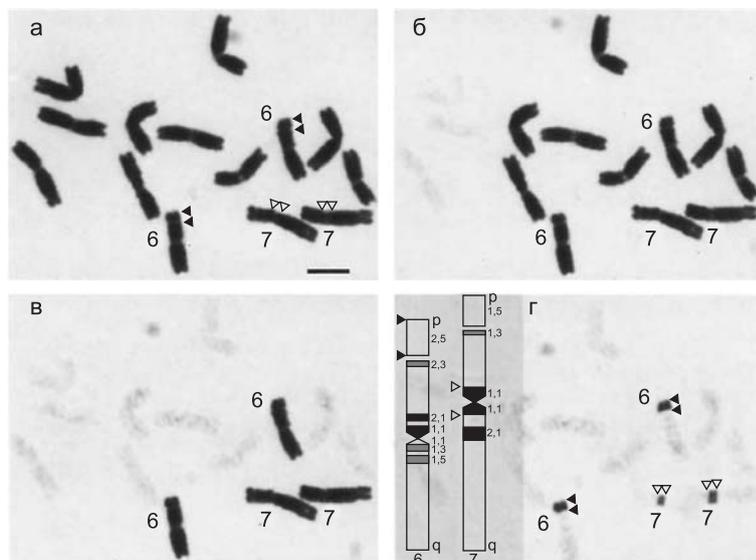


Рис. 19. Лазерная микродиссекция – выжигание ненужных участков препаратов с помощью лазерного луча. На препарате остаются только предназначенные для работы фрагменты хромосом (Fukui *et al.*, 1992. P. 787–791).

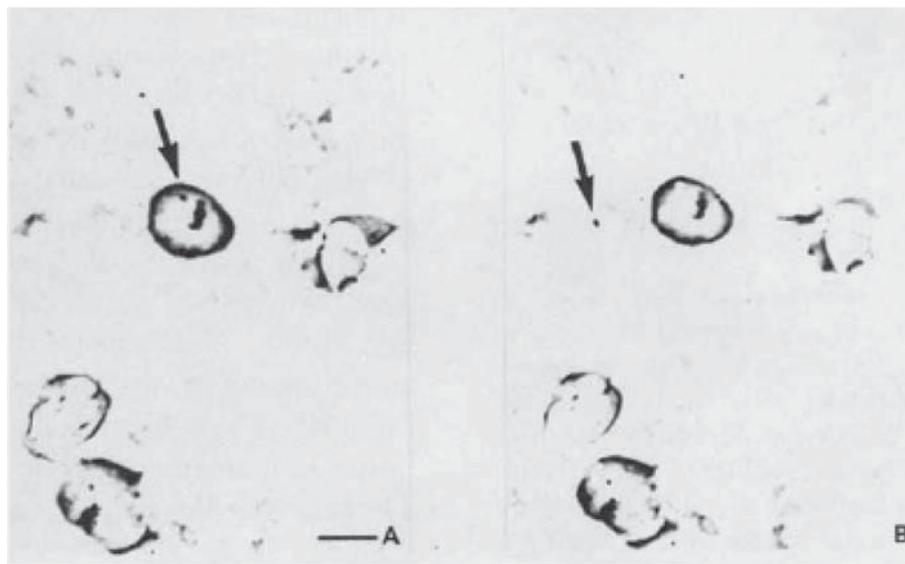


Рис. 20. Вырезание с помощью стеклянной микроиглы, присоединенной к микроманипулятору, отдельных хромосом или их фрагментов, предназначенных для анализа (Jung *et al.*, 1992. P. 503–511).

микропробирки и используют для получения зондов для гибридизации *in situ* или молекулярно-генетического анализа, создания клонотек и решения других задач. Несмотря на то что с помощью микродиссекции можно собрать существенно меньшее число копий хромосомы по сравнению с проточной флюориметрией, этот метод обладает рядом преимуществ. Во-первых, он позволяет исследователю манипулировать не только целыми хромосомами, но и их отдельными участками. Помимо этого, для проведения микродиссекции достаточно небольшого количества материала: на настоящий момент разработаны технологии, позволяющие изучать единичные хромосомы, вырезанные из препаратов.

Как и в случае проточной флюориметрии, при проведении микродиссекции необходимо, чтобы «целевую» хромосому можно было узнать на хромосомном препарате. При работе с препаратами человека и животных хромосомы окрашивают с помощью G-бэндинга, не повреждающего хромосомную ДНК. Все методы дифференциального окрашивания хромосом растений включают обработки растворами кислот и щелочей, разрушающих ДНК и делающих ее непригодной для амплификации. В связи с этим у растений микродиссекцию проводят или на хромосомах, значительно отличающихся от основного набора по морфологии (например,

половых хромосомах *Silene latifolia*), в мейозе моносомных или чужеродно-замещенных/дополненных линий, в которых целевая хромосома находится в унивалентном состоянии или на телоцентрических, транслокационных или делеционных линиях.

ОСНОВНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ХРОМОСОМНОГО АНАЛИЗА РАСТЕНИЙ

Идентификация хромосом

Основной целью разработки методов дифференциального окрашивания является точная идентификация всех хромосом в кариотипе организма, и эта задача остается актуальной вплоть до настоящего времени. У растений основными методами хромосомного анализа, позволяющими выявлять индивидуальность хромосом, являются различные варианты дифференциального окрашивания и гибридизация *in situ*.

Метод флюоресцентного бэндинга применяют для идентификации хромосом разных растений. Рисунки дифференциального окрашивания, получаемые с помощью флюоресцентного и С-бэндинга, могут значительно отличаться, что, в частности, наблюдается у злаков. У других видов, например лилейных и большинства мелкохромосомных растений, позиции DAPI

блоков совпадают с локализацией конститутивного ГХ, выявляемого С-методом, в связи с чем эти два метода могут заменять друг друга. Дифференциальная флюоресценция часто появляется после проведения гибридизации *in situ*, при этом положение ярко или тускло флюоресцирующих блоков служит вспомогательным маркером для идентификации хромосом.

У злаков для идентификации хромосом обычно используют метод С-бэндинга (рис. 21, в), который позволяет безошибочно узнавать все хромосомы пшеницы, ржи, ячменя, овса, а также диких сородичей этих культур. Наиболее подробно с помощью этого метода изучены хромосомы мягкой пшеницы; для нее разработана стандартная классификация хромосом (рис. 14) и принципы номенклатуры бэндов. С-бэндинг позволяет не только проводить полную идентификацию хромосом этого вида, но

и выявлять различия между сортами. Помимо дифференциального окрашивания, для идентификации хромосом злаков применяют метод гибридизации *in situ* с видоспецифичными или геном-специфичными ДНК-последовательностями или пробами рРНК генов (рис. 21, а, б). В молекулярной цитогенетике пшеницы чаще всего используют В-геном-специфичный повтор рSc119.2 и D-геномный повтор рAs1; комбинация этих зондов позволяет распознавать 19 из 21 пары хромосом. У овса имеющийся набор FISH маркеров позволяет только разделять геномы и узнавать хромосомы, несущие локусы рРНК генов, тогда как с помощью С-бэндинга можно полностью идентифицировать хромосомы всех существующих видов. Для хромосом ячменя Kato (2011) создал набор из 5 ДНК-зондов, позволяющих с высокой точностью проводить идентификацию хромосом этого вида;

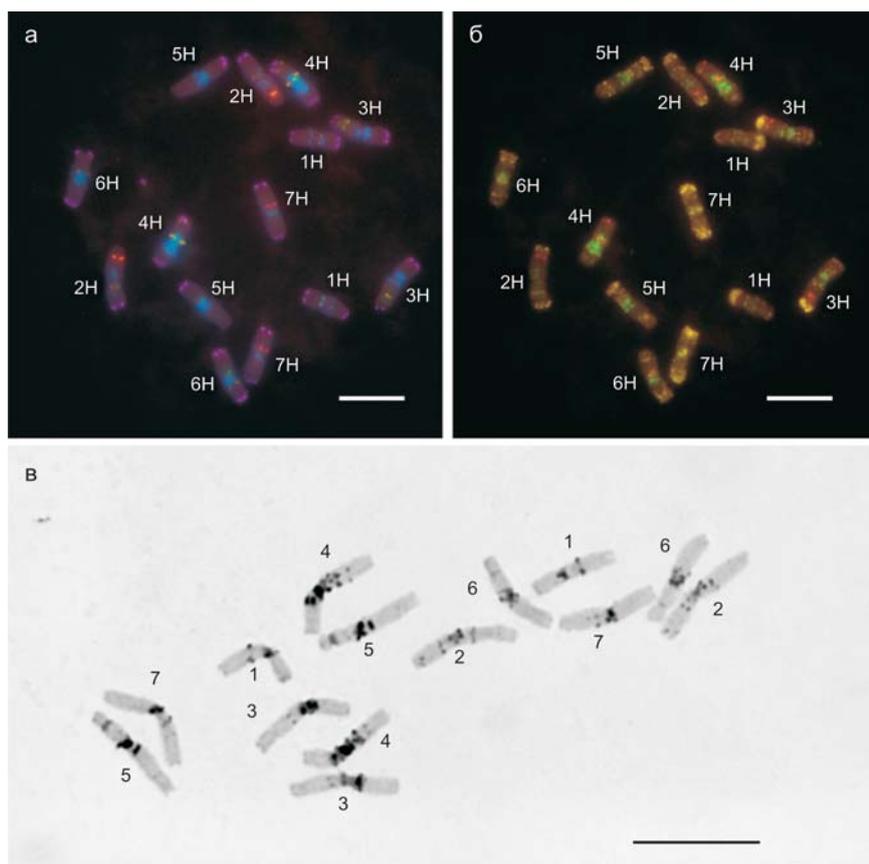


Рис. 21. Метафазная пластинка ячменя сорта Emir.

а – комбинация проб: рHv-38 – красный, TAG – зеленый, рHv-961 – фиолетовый, рHv-365 – желтый и GAA – голубой; б – комбинация проб: рHv-38, рHv-365 и GAA (Kato 2011); в – С-окрашенная метафазная пластинка культурного ячменя (HOR 4719-1974). Хромосомы идентифицированы с соответствии с рисунками бэндинга и классифицированы по единой генетической номенклатуре хромосом злаков. Масштабная линейка – 10 μm .

полученные им зонды маркируют не только проксимальные районы хромосом, окрашивающиеся С-методом, но и дистальные участки, не содержащие С-бэндов.

Для идентификации хромосом мелкохромосомных видов растений, характеризующихся четкими С-блоками только в прицентромерных районах хромосом, используют гибридизацию *in situ* с ДНК зондами на основе сателлитных ДНК, маркирующими каждую хромосому или хромосомное плечо (рис. 22). В настоящее время несколько лабораторий, в основном из США и Китая, работают над созданием наборов хромосомоспецифичных ДНК-зондов для видов хозяйственно полезных растений с мелким размером хромосом, таких как хлопчатник, огурец, тыква и другие.

FISH с использованием зондов рРНК генов и клонированных семейств сателлитных повторов является также наиболее эффективным методом идентификации хромосом хвойных растений.

Создание и поддержание коллекций генетических линий

Хромосомный анализ является необходимым инструментом для создания и поддержания коллекций генетических линий. Он необходим как для идентификации хромосом при получении таких линий, так и для контроля за наследованием структурно измененных хромосом. Это связано

с тем, что в мейозе у анеуплоидов нередко происходит смена унивалентов, что приводит к замене одной моносомной или телоцентрической хромосомы на другую. Помимо этого, анеуплоидия может индуцировать вторичные хромосомные перестройки, которые необходимо учитывать при работе с генетическими линиями.

Методы N- и С-окрашивания использовали при создании серии делеционных линий мягкой пшеницы, а затем и делеционных линий хромосом других злаков (рожь, ячмень). Поскольку рожь и ячмень являются диплоидами, анеуплоидия или делеция хромосом в гомозиготном состоянии для них летальны. В связи с этим для получения делеционных линий по хромосомам N- и R-геномов использовали наборы созданных ранее дополненных пшенично-ячменных или пшенично-ржаных линий.

Анализ отдаленных гибридов

Одной из наиболее востребованных областей применения хромосомного анализа растений является анализ отдаленных гибридов. Отдаленная гибридизация используется в селекции многих сельскохозяйственных культур для введения ценных признаков от диких сородичей в геном культурного растения. Показано, что многие зарубежные и российские сорта мягкой пшеницы содержат замещения или транслокации с хромосомами ржи, пырея и других видов. Быст-

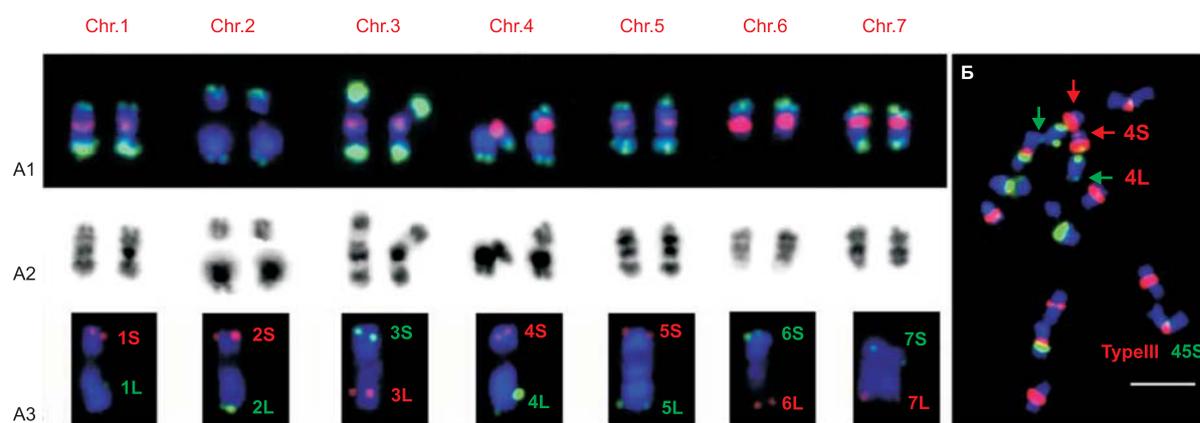


Рис. 22. Интеграция генетической и цитологической классификации хромосом огурца.

A1 – распределение повторов типа I/II (зеленый) и типа III (красный) на хромосомах огурца; A2 – инвертированное DAPI окрашивание; A3 – локализация хромосомоспецифичных фосмидных клонов на плечах индивидуальных хромосом; Б – локализация фосмиды 4S (красная) и 4L (зеленая) вместе с повторами типа Type III (красная) и 45S рДНК (зеленая) на митотических хромосомах. Масштабная линейка = 2,5 μm (Ren *et al.*, 2009. e5795).

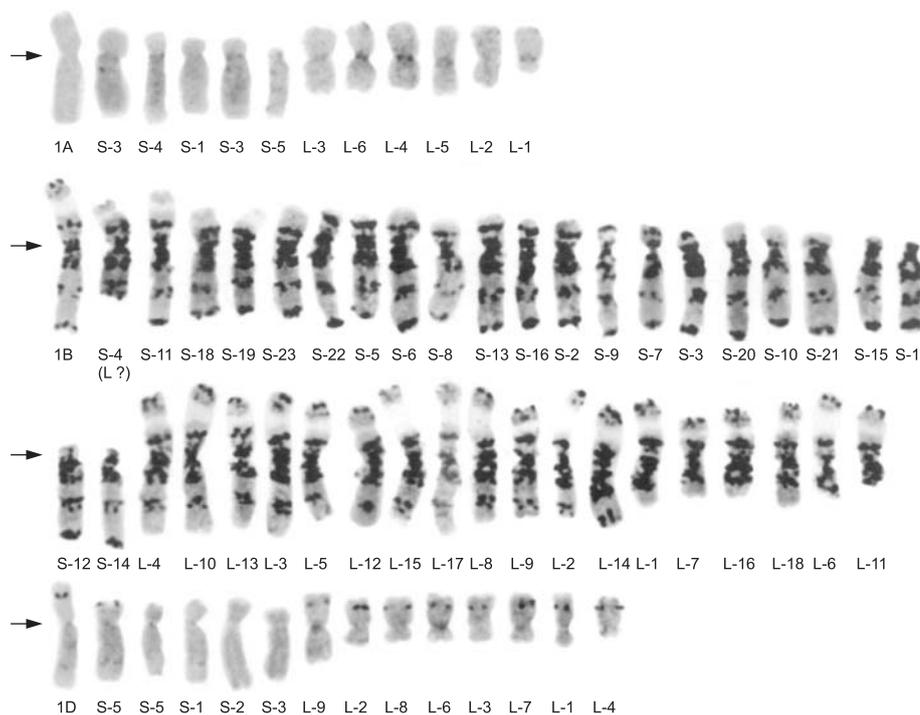


Рис. 23. Рисунки С-окрашивания нормальных и делетированных хромосом 1-й гомеологической группы пшеницы Chinese Spring.

Стрелками обозначено положение центромерных районов. За нормальной хромосомой (слева) следуют делетированные хромосомы по короткому и затем длинному плечам (Endo, Gill, 1996. P. 295–307).

рым и точным методом детекции чужеродного генетического материала у таких форм является С-дифференциальное окрашивание (рис. 24). В то же время этот подход недостаточно эффективен для выявления интрогрессии в участки хромосом, лишенные гетерохроматических блоков. В таком случае точное представление о числе и размерах интрогрессированных фрагментов генома донора в геном вида-реципиента можно получить с помощью геномной гибридизации *in situ* (рис. 25, а), избирательно окрашивающей участки чужеродной ДНК.

Идентификацию интрогрессированных хромосом или хромосомных фрагментов можно также проводить методом гибридизации *in situ* с геном-специфичными ДНК-зондами (рис. 25, б). В случае, когда в замещение или транслокацию вовлечена хромосома D-генома пшеницы, предпочтительнее использовать гибридизацию *in situ* с несколькими D-геном-специфичными ДНК-зондами, поскольку число получаемых с их помощью маркеров намного превышает число ГХ блоков, выявляемых С-бэндингом.

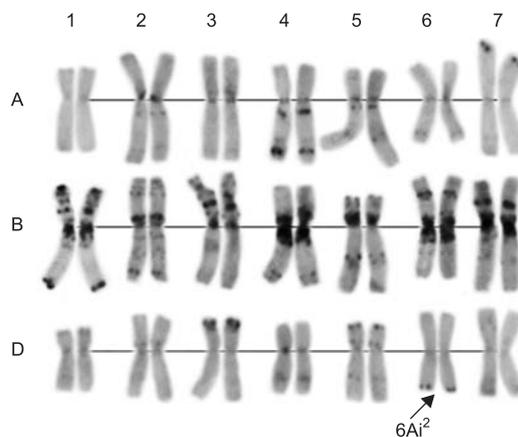


Рис. 24. Кариотип мягкой пшеницы сорта Тулайковская-10.

1–7 – гомеологические группы; А, В, D – геномы. 6A1² – хромосома пырея.

В отличие от других методов исследования, в том числе основанных на использовании молекулярных маркеров, только хромосомный анализ способен достаточно быстро предоставить полную информацию о генетической

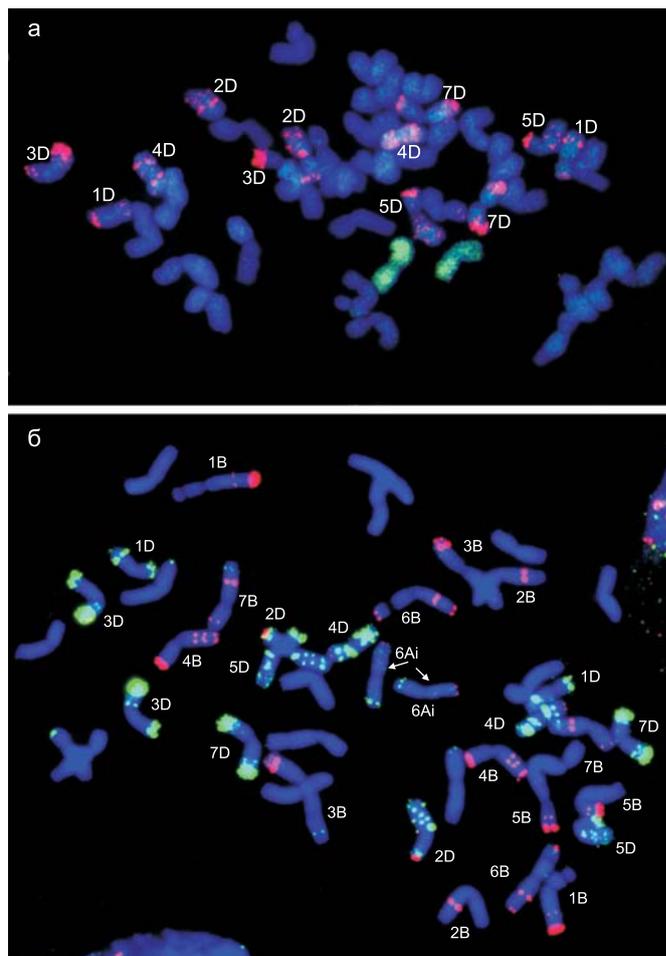


Рис. 25. Гибридизация *in situ* на хромосомах мягкой пшеницы сорта Тулайковская-10.

а – GISH с геномной ДНК *Agropyrum glaucum* (зеленый) и D-геном-специфичным повтором pAs1 (красный) (фото к.б.н. И.Г. Адониной, ИЦиГ СО РАН, Новосибирск); б – FISH с pSc119.2 (красный) и pAs1 (зеленый) зондами (фото к.б.н. А.А. Шишкиной, ИОГен РАН, Москва).

структуре гибридной формы. На основе этих данных можно целенаправленно подбирать другие типы маркеров для точной оценки размеров и локализации интрогрессированных фрагментов.

Выявление и анализ хромосомных перестроек

Хромосомные перестройки являются одним из механизмов эволюции и внутривидовой дивергенции растений. Они встречаются примерно у 20 % образцов полиплоидных пшениц (Badaeva *et al.*, 2007), в некоторых странах до 40 % сортов могут содержать определенные типы транслокаций (например, T5B:7B у французских сортов мягкой пшеницы). Возможно, что некоторые хромосомные перестройки имеют адаптивное значение и благодаря этому широко распространяются среди растений в отдельных географических популяциях. В то

же время гетерозиготность по транслокациям может приводить к нарушениям мейоза и стерильности. В настоящее время хромосомный анализ является единственным надежным способом выявления и идентификации хромосомных aberrаций у растений. Для их детекции используют анализ мейотической конъюгации хромосом в гибридах, а также анализ митотических хромосом методами дифференциального окрашивания и гибридизации *in situ* с геном-специфичными ДНК зондами или зондами, специфическими для отдельных хромосомных плеч.

Наиболее сложными для идентификации являются транслокации, затрагивающие эухроматические районы двух хромосом. Для их выявления необходимо привлекать дополнительные методы, в частности GISH (если транслокация затронула хромосомы разных геномов) или FISH с ДНК-зондами, маркирующими оба плеча каждой хромосомы.

Филогенетические исследования

Хромосомный анализ применяют при оценке филогенетического родства видов и родов растений, исследования процессов внутривидовой дивергенции, определения происхождения полиплоидных форм и установления гомеологии хромосом. Для решения каждой конкретной задачи необходимо выбирать наиболее подходящие методы исследования. Так, анализ внутривидового разнообразия целесообразно проводить с помощью наиболее полиморфных маркеров, например, рисунков С-окрашивания (рис. 26). Исследования, проведенные на пшенице, овсах, ржи, ячмене, лилейных, показали перспективность этого подхода для изучения процессов внутривидовой дивергенции и оценки генетического сходства популяций, определения возможных центров происхождения и одомашнивания культурных растений, выявления возможных путей их распространения. Рисунки С-бэндинга каждого вида растений индиви-

дуальны, при этом особенности распределения ГХ блоков на хромосомах родительских форм сохраняются и у их полиплоидных потомков. В связи с этим С-окрашивание, наряду с другими методами, используют для поиска родительских форм полиплоидных видов растений.

В то же время, метод С-окрашивания оказался малоинформативным для определения генетического родства (гомеологии) хромосом родственных видов. У видов *Triticeae* ценными маркерами, позволяющими установить принадлежность некоторых хромосом к одной из трех гомеологических групп (1-я, 5-я и 6-я), являются локусы 5S и 18S-5.8S-45S рРНК генов. Это обусловлено тем, что относительное расположение рДНК локусов на хромосомах злаков является высококонсервативным признаком геномов или групп геномов, позволяющим проводить их идентификацию. Эти маркеры активно используются и для оценки филогенетических взаимосвязей других групп растений, как однодольных, так и двудольных.

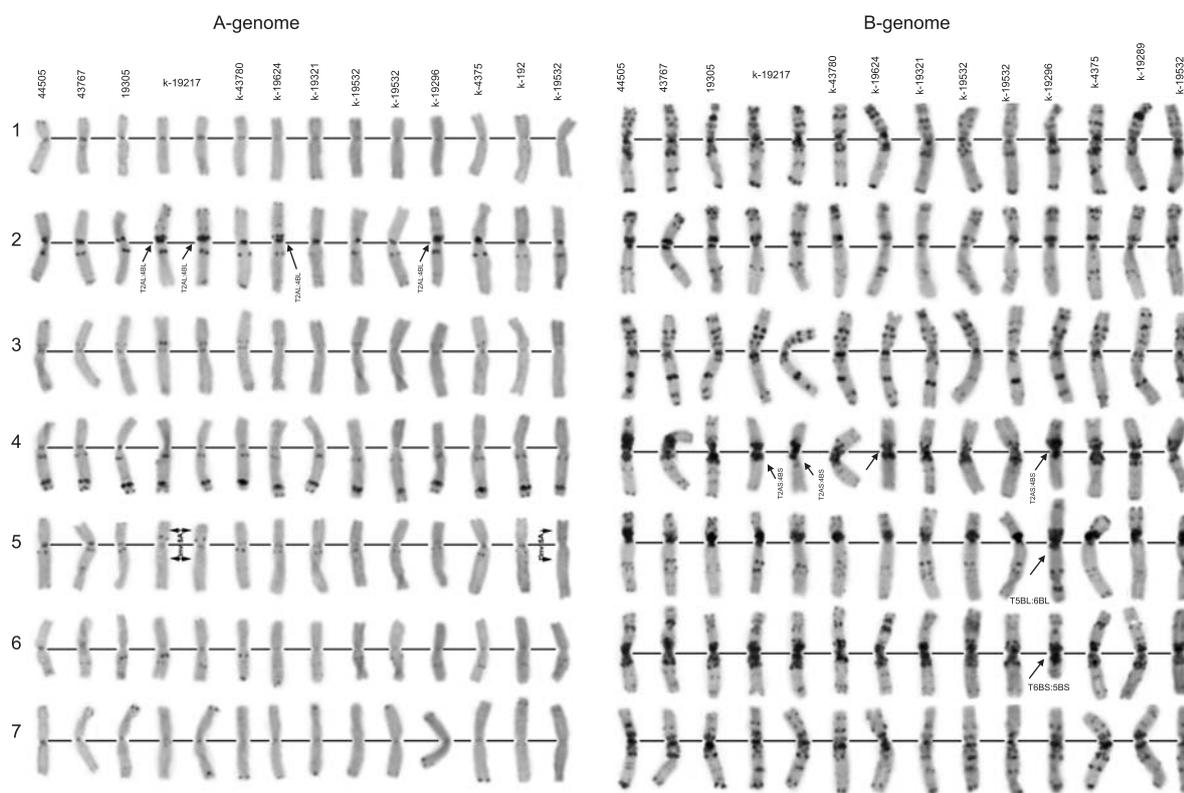


Рис. 26. Оценка внутривидового разнообразия пшеницы *T. aethiopicum* с помощью С-бэндинга.

1–7 – гомеологические группы. Стрелками отмечены транслоцированные хромосомы.

Физическое картирование хромосом

Определение хромосомной локализации генных или других ДНК-последовательностей проводят с помощью метода гибридизации *in situ*. Картирование высокоповторяющихся ДНК не представляет сложности; такие зонды широко применяют для идентификации хромосом самых разных растений. В то же время, картирование индивидуальных генов представляет значительные трудности из-за избыточного содержания повторов и особенностей организации хромосом. Несмотря на то что первые успешные результаты по локализации генов на хромосомах были опубликованы еще в 90-х гг. XX в., значительного прогресса в этой области удалось достичь после разработки метода получения препаратов хромосомных фибрилл, создания системы тирамидной амплификации сигнала, а также совершенствования систем регистрации изображений (рис. 27). Благодаря

этому на хромосомах растений стало возможным картировать последовательности ДНК длиной менее 3 т.п.н.

Изучение структурной организации хромосом

Для анализа структурной организации хромосом растений используют весь комплекс методов хромосомного анализа. Проточная флуориметрия и микродиссекция помогают в поиске новых ДНК-последовательностей и создании зондов для гибридизации, тогда как с помощью FISH эти зонды картируют на хромосомах. Дифференциальное окрашивание выявляет блоки гетерохроматина, АТ- и ГЦ-богатые участки на хромосомах. С помощью иммуноцитохимии определяют локализацию специфических белков (кинетохорных, белков, связанных с рекомбинацией). Fiber FISH анализирует тонкую структуру отдельных районов хромосом – центромерных,

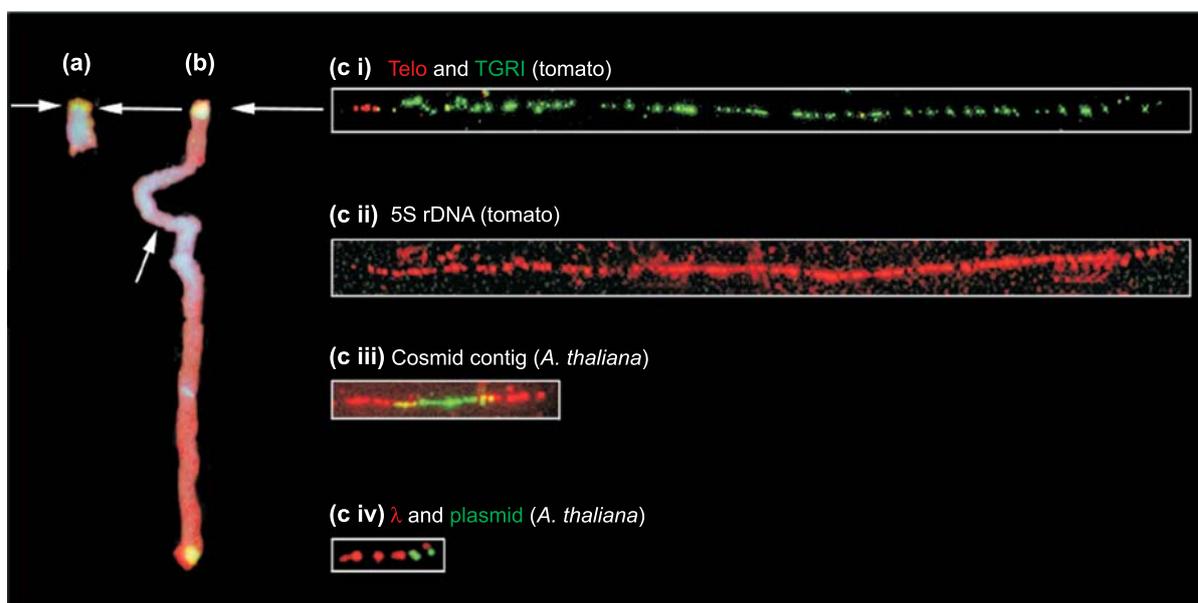


Рис. 27. Флуоресцентная гибридизация *in situ* на хромосоме томата и на вытянутых ДНК фибриллах.

Рисунки (а) и (б) даны при одном увеличении. а – хромосома на стадии метафазы митоза, окрашенная DAPI, длиной 2,6 μm , с дистальным зеленым сигналом субтеломерного повтора TGR1. Стрелкой обозначена позиция центромеры; б – пахитенный бивалент хромосомы 6 томата длиной 39,3 μm , с теломерным и TGR-1 повторами. Гетерохроматин и эухроматин хорошо дифференцируются. Стрелкой обозначена позиция центромеры; в – примеры FISH с разными пробами, гибридизованными на вытянутых фибриллах хроматина; (с i) – теломерный повтор длиной 16 т.п.н. (красный) и субтеломерный повтор TGR1 длиной 408 т.п.н. (зеленый) на дистальном конце короткого плеча хромосомы 6 томата; (с ii) – повтор 5S рДНК (657 т.п.н.) в перичентромерном гетерохроматине короткого плеча хромосомы томата; (с iii) – три частично перекрывающиеся космиды в контиге *Arabidopsis* (de Jong *et al.*, 1999. P. 258–263).

субтеломерных (рис. 27); с ее помощью определяют положение разных типов последовательностей относительно друг друга.

Исследования функциональной активности хромосом

В изучении функциональной активности хромосом основными методами исследования являются иммуноцитохимия, а также разные варианты дифференциального окрашивания – серебрение, «арлекинное окрашивание» и репликативный бэндинг. Нередко эти методы используются одновременно или дополняют друг друга. С их помощью изучают такие сложные процессы, как ядрышковое доминирование (методы серебрения и иммуноцитохимии), рекомбинация и репарация («арлекинное окрашивание» и иммуноцитохимия), репликация (репликативный бэндинг и иммуноцитохимия), эпигенетический сайленсинг (иммуноцитохимия), митоз и мейоз. Очевидно, что в этой области исследований все возрастающую роль играют и будут играть иммуноцитохимические методы с использованием антител к белкам, участвующим в разных клеточных процессах, или формам модифицированных гистонов, белкам клеточного аппарата и т. д.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в соответствии с Программой ФНИ (проект № VI.53.1.5.) и при поддержке РФФИ и программы РАН «Динамика и сохранение генофондов».

ЛИТЕРАТУРА

- Сергеева Е.М., Салина Е.А. Мобильные элементы и эволюция генома растений // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 2. С. 585–600.
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G. *et al.* Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution // *Genome*. 2007. V. 50. No. 10. P. 907–926.
- Bennett M.D. Plant genome values: How much do we know? // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. No. 5. P. 2011–2016.
- Cabrera A., Martin A. *et al.* *In situ* comparative mapping (ISCM) of *Glu-1* loci in *Triticum* and *Hordeum* // *Chrom. Res.* 2002. V. 10. No. 1. P. 49–54.
- Chen R., Song W., Li X., An Z. Chromosome G-banding in plants by inducing with trypsin and urea[ast] // *Cell Res.* 1994. V. 4. No. 1. P. 79–87.
- Choulet F., Wicker T., Rustenholz C. *et al.* Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces // *Plant Cell*. 2010. V. 22. No. 6. P. 1686–1701.
- de Jong J.H., Franz P., Zabel P. High resolution FISH in plants – techniques and applications // *Trends Plant Sci.* 1999. V. 4. No. 7. P. 258–263.
- Doležel J., Šimková H., Kubaláková M. Chromosome genomics in the Triticeae // *Genetics and Genomics of the Triticeae* / Eds G.J. Muehlbauer, C. Feuillet. N.Y., Springer, 2009. 7. Part 2 (Tools, Resources and Approaches). P. 285–316.
- Endo T.R., Gill B.S. The deletion stocks of common wheat // *J. Hered.* 1996. V. 87. No. 4. P. 295–307.
- Fukui K.N., Suzuki G., Lagudah E.S. *et al.* Physical arrangement of retrotransposon-related repeats in centromeric regions of wheat // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. No. 2. P. 189–196.
- Fukui K., Minezawa M., Kamisugi Y. *et al.* Microdissection of plant chromosomes by argon-ion laser beam // *Theor. Appl. Genet.* 1992. V. 84. No. 7. P. 787–791.
- Gale M.D., Devos K.M. Comparative genetics in the grasses // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. No. 5. P. 1971–1974.
- Gill B.S., Friebe B., Endo T.R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*) // *Genome*. 1991. V. 34. No. 5. P. 830–839.
- Hřibová E., Doleželová M., Town C.D. Isolation and characterization of the highly repeated fraction of the banana genome // *Cytogenet. Genome Res.* 2007. V. 119. No. 3/4. P. 268–274.
- Jones J.D.G., Flavell R.B. The mapping of highly-repeated DNA families and their relationship to C-bands in chromosomes of *Secale cereale* // *Chromosoma*. 1982. V. 86. No. 5. P. 595–612.
- Jung C., Claussen U., Horstemke B. *et al.* A DNA library from an individual *Beta patellaris* chromosome conferring nematode resistance obtained by microdissection of meiotic metaphase chromosomes // *Plant Mol. Biol.* 1992. V. 20. No. 3. P. 503–511.
- Kakeda K., Yamagata H. Immunological analysis of chromosome replication in barley, rye, and durum wheat by using an anti-BrdU antibody // *Hereditas*. 1992. V. 116. P. 67–70.
- Kato A. High-density fluorescence *in situ* hybridization signal detection on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosomes with improved probe screening and reprobing procedures // *Genome*. 2011. V. 54. No. 2. P. 151–159.
- Lysak M.A., Pecinka A., Schubert I. Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species // *Chrom. Res.* 2003. V. 11. No. 3. P. 195–204.
- Meyers L.A., Levin D.A. On the abundance of polyploids in flowering plants // *Evolution*. 2006. V. 60. No. 6. P. 1198–1206.
- Moore G. Cereal chromosome structure, evolution, and pairing // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2000. V. 51. No. 1. P. 195–222.
- Pardue M.L., Gall J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA // *Science*. 1970. V. 168. No. 3937. P. 1356–1358.
- Ren Y., Zhang Z., Liu J. *et al.* An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome // *PLoS ONE*.

2009. V. 4. No. 6. e5795.
- Salina E.A. Tandem repeats in evolution of polyploid wheat and *Aegilops* section *Sitopsis* // Israel J. Plant Sci. 2007. V. 55. No. 3/4. P. 231–240.
- Sandhu D., Gill K.S. Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes // Plant Physiol. 2002. V. 128. No. 3. P. 803–811.
- Santos J.L., Lacadena J.R., Cermeño M.C., Orellana J. Nucleolar organiser activity in wheat-barley chromosome addition lines // Heredity. 1984. V. 52. No. 3. P. 425–429.
- Schmidt T., Heslop-Harrison J.S. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes // Trends Plant Sci. 1998. V. 3. No. 5. P. 195–199.
- Tek A., Jiang J. The centromere regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence // Chromosoma. 2004. V. 113. No. 2. P. 77–83.
- Vosa C.G. Heterochromatin recognition with fluorochromes // Chromosoma. 1970. V. 30. No. 3. P. 366–372.
- Vrana J., Kubalaková M., Simková H. *et al.* Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // Genetics. 2000. V. 156. No. 4. P. 2033–2041.
- Weiss H., Scherthan H. *Aloe* spp. – plants with vertebrate-like telomeric sequences // Chromosome Res. 2002. V. 10. No. 2. P. 155–164.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. Н-Л.: Издательство, 2010.
- Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика: энциклопедический словарь. Минск: Тэхналогія, 1999.
- Льюин Б. Гены. Изд-во «Мир», 1987.
- Appels R., Morris R., Gill B.S., May C. Chromosome Biology. Boston a.o.: Kluwer Acad. Publ., 1998. P. 256–265.