

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.08

**НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ
ДЕНАТУРАЦИОННОЙ И БЕЗДЕНАТУРАЦИОННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ
IN SITU ПРИ ИЗУЧЕНИИ ХРОМОСОМ ЗЛАКОВ****В.М. Кузнецова^{1,2}, О.В. Разумова^{1,3}, Г.И. Карлов^{1,2}, Т.С. Данг², П.Ю. Крупин^{1,2},
М.Г. Дивашук^{1,2,*}**¹Лаборатория прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42;²Центр молекулярной биотехнологии РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49;³Лаборатория молекулярной систематики, Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина РАН, Россия, 127276 г. Москва, ул. Ботаническая, д. 4

*e-mail: divashuk@gmail.com

Безденатурационная флуоресцентная гибридизация *in situ* (ND-FISH) – удобный метод цитогенетических исследований. По сравнению со стандартной методикой ND-FISH отличается скоростью и простотой исполнения, требует меньше времени, реактивов и приборной базы, поэтому набирает все большую популярность у разных групп ученых и используется для решения разнообразных научных задач. Однако при использовании данного метода для изучения хромосом злаков мы столкнулись с некоторыми особенностями его применения в сочетании с олигонуклеотидными пробками. В данной работе мы сравнили три модификации: два разных варианта денатурационного метода и безденатурационной FISH. В общепринятой методике FISH для растений и ее модификациях хромосомы подвергаются обработке с добавлением формамида при высокой температуре, в результате чего происходит денатурация сверхспирализованной ДНК хромосом растений. В методике безденатурационной FISH этот этап опущен, что позволяет сохранить структуру хромосом, экономит время и ресурсы. В нашей работе все методики показали свою эффективность. Безденатурационная ND-FISH отличается простотой и удобством, однако меньшей воспроизводимостью в ряде экспериментов. Стандартный метод и его модификация наиболее стабильны и надежны, но могут негативно сказываться на морфологии хромосом. При последовательных гибридизациях с использованием тех же препаратов (sequential FISH) мы рекомендуем сочетание данных методов – с первичным проведением FISH по стандартному протоколу и последующими гибридизациями методом ND-FISH.

Ключевые слова: *FISH, ND-FISH, безденатурационная гибридизация in situ, методы молекулярной цитогенетики, тритикале*

Кариотип – одна из важнейших характеристик вида. Со времен изобретения первого микроскопа и открытия хромосом методы исследования кариотипов все время совершенствовались. Таких классических морфологических маркеров хромосом, как положение центромеры, абсолютная и относительная длина хромосомы, размер и положение плеч и сателлитных регионов хромосом, недостаточно для надежной идентификации отдельных хромосом, особенно у растений, многие из которых являются мультигеномными, полиплоидными видами, объединяющими в своих кариотипах несколько групп гомеологичных хромосом.

С открытием ДНК и изобретением методов молекулярной цитогенетики проблема идентификации отдельных хромосом растений и построения надежных кариотипов получила новое решение. В свое время прорывом в области идентификации хромосом стало изобретение различных методов окрашивания хромосом, в частности, Q-, G-, C- и N-бэндинг. Основой для Q-бэндинга стала специфичная флуоресценция акрихина в AT-богатых регионах хроматина. Основой для G- и C-бэндинга стало специфичное связывание красителя Гимза с гетерохроматиновыми регионами хромосом, в результате чего появляется специфичная исчер-

ченность хромосом. N-бэндинг позволяет с помощью окрашивания хромосом раствором нитрата серебра выявлять ядрышкообразующие районы. Данные методы позволяют отличить отдельные хромосомы растений друг от друга. Однако эти методы имеют ряд существенных ограничений. Во-первых, не все виды обладают хромосомами с ярко выраженным чередованием эухроматиновых и гетерохроматиновых участков. Во-вторых, данные методы требуют наличия у растения достаточно крупных хромосом, чтобы можно было отличить бэнды друг от друга. В-третьих, такие подходы не позволяют визуализировать отдельные последовательности ДНК на хромосоме. Наконец, такого рода окрашивания не способны выявлять перестройки, которые произошли внутри эухроматиновых участков, или физически локализовать гены. В отличие от дифференциального окрашивания, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) не имеет этих ограничений, не связана с содержанием пуриновых и пиримидиновых оснований и имеет более широкие возможности. С использованием FISH можно увидеть локализацию любого достаточно протяженного (около 10 т.п.н. для FISH и менее 1 т.п.н. для модификации FISH) участка ДНК на хромосоме. К недостаткам этого метода можно отнести его высокую стоимость и трудоемкость. С использованием FISH решаются такие задачи, как выявление чужеродного генетического материала, идентификация гомологичных пар хромосом, изучение пола и половых хромосом, выполняются эволюционные и многие другие исследования [1–10]. В качестве зонда для FISH могут выступать меченые флуоресцентные специфичные последовательности ДНК (сателлитные повторы, EST-клоны, гены), геномная ДНК (такую модификацию принято называть геномной гибридизацией *in situ* – GISH), Cot-фракция ДНК, микросателлитные последовательности и т.д. Для мечения ДНК обычно используют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) либо ник-трансляцию или используют в качестве пробы короткие синтезированные олигонуклеотидные последовательности. Со времен изобретения метода и адаптации его для изучения растений было создано множество модификаций стандартного протокола FISH (BAC-FISH, FAST-FISH). Одной из таких модификаций, получившей широкое распространение благодаря скорости и удобству, стал метод безденатурационной FISH (non-denaturing fluorescence *in situ* hybridization – ND-FISH). В данной модификации денатурация хромосом не происходит, зонд гибридизуется с ДНК хромосом в течение часа без длительной предварительной подготовки и последующих долгих отмывок. Данный метод получает все более широкое распространение в цитогене-

тических исследованиях растений [4, 5, 11–13]. В данной работе мы сравнили эффективность трех методик FISH: два варианта денатурационного метода: по стандартной методике с небольшими модификациями [14] (denaturing fluorescence *in situ* hybridization – D-FISH) и по Като [15, 16], а также ND-FISH [3] для исследования злаков с использованием синтезированных олигонуклеотидных зондов с флуорофорами.

Материалы и методы

Исследования выполнялись на тритикале (*Triticale*) сорта Соловей Харьковский (геномный состав ABR; $2n=6x=42$). Для приготовления препаратов метафазных хромосом использовали корневые меристемы. Для получения молодых активно растущих корней растения круглогодично выращивались в теплице.

Предфиксационную обработку проводили в насыщенном растворе α -бромнафталина при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение суток. Фиксацию преобработанных корневых меристем проводили в 45%-ной уксусной кислоте, после чего зафиксированный материал хранили также в 45%-ной уксусной кислоте при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ не более двух недель. Постоянные давленные препараты готовили после обработки корневых меристем ферментами. Раствор ферментов содержал 0,01% пектиназы и целлюлазы (Sigma-Aldrich, Германия) в цитратном буфере (pH 4,8). После приготовления препараты помещали в жидкий азот для фиксации хромосом на стекле.

В работе было апробировано три модификации флуоресцентной гибридизации *in situ*. Первая модификация, названная нами «стандартным» методом FISH (denaturing fluorescence *in situ* hybridization – D-FISH), включала в себя следующие этапы. Для первичной дегидратации стекла помещали на ночь в термостат при температуре 37°C . Подготовку препаратов начинали с обработки раствором РНКазы в концентрации 100 мкг/л (1:100) в двухкратном высокосолеовом цитратном буфере (2xSSC, saline sodium citrate), добавляя на каждое предметное стекло 100 мкл раствора. Накрывали покровным стеклом и инкубировали во влажной камере 1 ч при 37°C . После трехкратной промывки в буфере 2xSSC стекла 10 мин инкубировали в 4%-ном параформальдегиде. Затем опять следовали трехкратная отмывка в 2xSSC и дегидратация с использованием батареи спиртов (в 70%-ном, 90%-ном и 96%-ном этаноле по 3 мин в каждом). Далее следовала гибридизация. Смесь для гибридизации состояла из 20 мкл формамида, 8 мкл 50%-ного декстрансульфат, 4 мкл 20xSSC, 1 мкл 10%-ного раствора натриевой соли лаурилсерной кислоты (SDS, sodium dodecyl sulfate), 20 нг/стекло олигонуклеотидного зонда. Смесь для

гибридизации предварительно нагревали до 70°C, а затем быстро, перед нанесением, охлаждали на льду. Денатурацию проводили при 80°C в течение 5 мин, а затем оставляли во влажной камере при 37°C на ночь. На второй день проводили отмывку стекол от смеси в растворе 2x SSC при 42°C 15 мин на водяной бане с качалкой. После отмывки проводили контр-окрашивание 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (1:100 в 2xSSC) 10 мин и заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories, США).

Вторая методика D-FISH подробно описана у Комуро [15] и Като [16]. Первые этапы, до момента гибридизации, не отличаются от описанного метода стандартной гибридизации *in situ*. Синтезированные олигонуклеотидные зонды с флуорофорами (20 нг/стекло) растворяются непосредственно в двухкратном высокосолеовом цитратном буфере (2xSSC), без других компонентов. Денатурация проводится на кипящей водяной бане при 100°C. После этого препараты охлаждают, помещая на лед. Методика требует определенных технических навыков, поскольку из-за высокой температуры денатурации стекла помещают в камеру особым образом. Инкубация и отмывка происходят при 55°C, отмывку стекол от гибридизационной смеси проводят в растворе 2xSSC с добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты с концентрацией в течение 20 мин. Далее проводится контр-окрашивание DAPI аналогично стандартной методике.

Безденатурационная FISH (non-denaturing fluorescence *in situ* hybridization – ND-FISH) также начинается с дегидратации путем инкубирования препаратов при 37°C всю ночь. Далее, без предварительных обработок, добавляли на стекла смесь для гибридизации (20 нг/стекло), состоящую только из необходимых зондов, разведенных в 2xSSC (1:100), и помещали в водяную баню на 42°C (1,5 ч). Отмывку от гибридизационной смеси проводили в течение 5 мин в 2xSSC при комнатной температуре. Контр-окрашивание DAPI проводили 20 мин при комнатной температуре (1:100) и заключали стекла в 15 мкл среды Vectashield.

Визуализация результатов проводилась на микроскопе Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой Axio Cam MRm Digital с использованием программного обеспечения AxioVision 4.6.

Прямые олигонуклеотидные зонды синтезировали в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия). В работе использовали пробу Oligo-pSc119.2-2, меченную флуоресцентными красителями тетраметилродамином (TAMRA) или карбоксифлуоресцеином (FAM) [3].

В каждом изучаемом варианте использовали 16 препаратов. Для нивелирования влияния синтеза зонда и используемого флуорофора на 8

препаратах использовали пробу Oligo-pSc119.2-2TAMRA и на 8 препаратах – Oligo-pSc119.2-2FAM с флуоресцентными красителями, ковалентно пришитыми к 5'-концу пробы [3].

Все препараты были приготовлены из одной партии одинаково и одновременно предобработанных и зафиксированных корешков.

Для последовательной FISH (sequential *in situ* hybridization) препараты отмывали по методике, описанной у Комуро [15], а далее использовали согласно следующему выбранному протоколу исследований. После каждой отмывки проводили окрашивание препаратов DAPI и анализировали, все ли зонды были удалены с хромосом. В случае наличия проб после отмывки процедура отмывки повторялась или препарат отбраковывался.

Результаты и обсуждение

Все проанализированные нами методы FISH позволили провести гибридизацию исследуемых зондов с ДНК хромосом. Однако в ходе выполнения работ были выявлены некоторые различия, которые описаны ниже.

Стандартный метод D-FISH. Все шестнадцать препаратов, исследованных с использованием данной методики, показали гибридизацию со всеми изученными зондами.

Несомненным достоинством данного метода является его стабильность. Все препараты со всеми зондами во всех экспериментах неизменно показывали один и тот же хороший результат. Были четко видны как яркие, мажорные блоки гибридизации зонда с ДНК хромосом, так и минорные сигналы. Результаты воспроизводились и были статистически достоверными.

Главным недостатком данного протокола следует считать его длительность (2 сут) и многокомпонентность смеси для гибридизации. Кроме того, в случае повторного использования препарата для последовательного-D-FISH (особенно на третий и последующие разы) возможны потери отдельных участков и даже целых хромосом. Условия денатурации в процедуре D-FISH (высокая температура, наличие формамида), а также жесткие условия отмывки зондов, разрушают структуру хромосом, и повторное многократное использование препаратов становится затруднительным. Между тем, возможность локализовать разные пробы на одних и тех же метафазных пластинках хромосом широко применяется в работах разных исследователей и очень ценна для решения определенных задач [6, 16–20].

Нами было выявлено несколько случаев кросс-контаминации коротких олигонуклеотидных зондов с препарата на препарат. Такое явление наблюдалось только при использовании в качестве зонда прямых олигонуклеотидов, при

гибридизации разных проб в одном эксперименте D-FISH. Мы связываем это явление с ограниченным объемом емкости для окрашивания препаратов, вязкостью гибридизационной смеси за счет использования 50%-ного декстрансульфата, неудачным расположением препаратов в емкости Хеллендаля (ориентацией «лицом к лицу»), большой концентрацией олигонуклеотидов в смеси, их коротким размером и универсальностью. Сочетание данных факторов приводит к тому, что у препаратов, обращенных друг к другу, длительно стоящих рядом при отмывке после гибридизации, зонды выходят в раствор буфера для отмывки, однако вязкая смесь для гибридизации на основе густого декстрансульфата не позволяет олигонуклеотидам раствориться в буфере и концентрация их локально повышается, что приводит к нежелательной кросс-гибридизации. Впервые обнаружив кросс-контаминацию зондов с препарата на препарат, мы провели дополнительные эксперименты с D-FISH для проверки нашей гипотезы. Препарат, в гибридизационную смесь которого не добавлялся зонд, помещали в сосуд Хеллендаля при отмывках после гибридизации рядом с препаратом с зондом ориентацией «лицом к лицу». После проведения стандартного протокола D-FISH сигналы были обнаружены на обоих препаратах. Ранее нам не встречалось описание подобных проблем в литературе. Такое явление наблюдалось только при использовании для гибридизации олигонуклеотидных зондов, и только при проведении денатурационной D-FISH с использованием смеси на основе декстрансульфата, однако отсутствовало в случае ND-FISH или при использовании зондов, приготовленных другими способами (зонды, полученные полимеразной цепной реакцией или ник-трансляцией). Для исключения случайной гибридизации мы рекомендуем проведение параллельных отмывок с использованием разных сосудов Хеллендаля. Такой проблемы не существует, если при проведении D-FISH используется только одна проба.

Метод D-FISH no Kamo, 2011. Данный метод несколько отличается от предыдущего варианта высокой (около 100°C) температурой денатурации, повышенной температурой во время отмывки, использованием специальной конструкции при гибридизации и отсутствием формамида в составе смеси для гибридизации. С точки зрения воспроизводимости результатов и стабильности, отличий от обычного стандартного метода D-FISH выявлено не было. Структура и морфология хромосом после проведения гибридизации с использованием данной методики также нарушается, и при повторном использовании препаратов для FISH гибридизация может получиться не очень удачной. Однако случаев «перехода» олигонуклеотид-

ной пробы со стекла на стекло отмечено не было. По-видимому, это связано с отсутствием такого вязкого компонента как 50%-ный декстрансульфат. В целом оба метода D-FISH показали стабильные результаты на всех препаратах и некоторое падение качества D-FISH при нескольких процедурах последовательной (повторной) гибридизации (sequential FISH).

ND-FISH. Метод безденатурационной FISH отличается простотой исполнения. Проба добавляется в раствор буфера 2xSSC, гибридизация происходит при 42°C в течение непродолжительного времени, после чего можно сразу приступить к контр-окрашиванию и визуализировать результат. Таким образом, по сравнению с традиционным методом, на сутки сокращается время проведения исследования, снижается расход реактивов и стоимость анализов. К безусловным достоинствам данной модификации также можно отнести и большую сохранность структуры хромосом, связанную с меньшим количеством различных температурных и химических воздействий, которым они подвергаются в процессе гибридизации при классических методах D-FISH.

Однако нами было отмечено, что результаты ND-FISH не всегда стабильны. Так, полностью

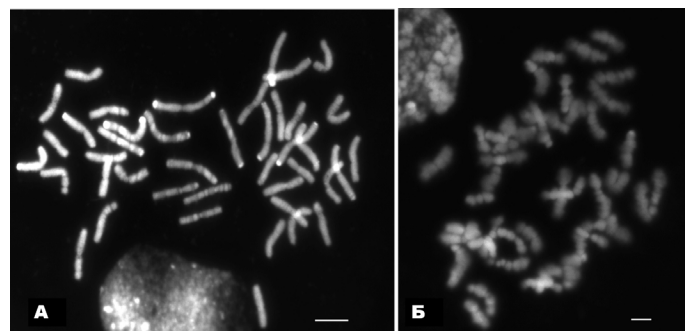


Рисунок. Морфология метафазных хромосом тритикале после трех процедур последовательной FISH. А. Последовательность процедур: D-FISH – ND-FISH – ND-FISH. Б. Последовательность процедур: D-FISH – D-FISH – D-FISH. Размер шкалы – 10 мкм.

успешной (наличие мажорных и минорных сигналов) оказалась гибридизация только на 10 препаратах из 16. На 4 препаратах было отмечено отсутствие большого количества минорных фрагментов на хромосомах, и на 2 препаратах гибридизация вовсе не наблюдалась. Поэтому для получения стабильных результатов, по-видимому, необходимо увеличивать количество повторностей при постановке экспериментов. Особенно требуется контролировать результаты, получаемые с ND-FISH при постановках *de novo* – при использовании проб с неизвестной локализацией (например, цитогенетический анализ данных полногеномного секвенирования) или переносе проб из одного вида в другой. С другой стороны, мы протести-

ровали процедуру безденатурационной гибридизации *in situ* при последовательной FISH после стандартной гибридизации *in situ* (по 5 препаратов на каждый вариант). Во всех случаях мы получили отличный стабильный результат. Кроме того, структура хроматина при использовании безденатурационного метода при последовательной FISH оставалась стабильной вплоть до четырех отмывок/гибридизаций (рисунок). По-видимому, такое существенное улучшение стабильности получаемых результатов для ND-FISH при последовательной FISH по сравнению с использованием этого метода в качестве первичной процедуры связано со сверхспирализованностью ДНК хромосом растений (в частности, злаков). При стандартном денатурационном методе для первой процедуры D-FISH мы частично убираем данную сверхспирализованность, что значительно облегчает дальнейшую процедуру ND-FISH.

Таким образом, мы провели сравнение трех модификации FISH с использованием меченых олигонуклеотидных зондов на хромосомах тритикале. Нами была отмечена относительная нестабильность безденатурационной гибридизации *in situ* (ND-FISH) при ее использовании в качестве первичной процедуры на препаратах, что свидетельствует о необходимости усилить контроль за

достоверностью результатов в случае, когда предпочтение отдается именно этой методике. Однако сохранность хромосом является значительным преимуществом данной модификации. Оптимальной схемой для наших исследований оказалось сочетание стандартной методики D-FISH для локализации проб на хромосомы с дальнейшими сериями последовательной FISH с использованием безденатурационного метода. В таком случае, во-первых, повышается стабильность ND-FISH, а во-вторых, меньше страдает морфология хромосом, что позволяет более длительное время использовать препарат и проводить на одном препарате до четырех процедур последовательной FISH. Нами впервые была отмечена проблема кросс-контаминации на соседние препараты при использовании традиционной методики и олигонуклеотидных проб. Мы рекомендуем проводить отмывки после гибридизации в разных сосудах во избежание кросс-гибридизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00097).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosato M., Álvarez I., Nieto Feliner G., Rosselló J.A. High and uneven levels of 45S rDNA site-number variation across wild populations of a diploid plant genus (*Anacyclus*, Asteraceae) // PLoS ONE. 2017. Vol. 12. N 10: e0187131.
2. Han F.P., Lamb J.C., Birchler J.A. High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. Vol. 103. N 9. P. 3238–3243.
3. Tang Z.X., Yang Z.J., Fu S.L. Oligonucleotides replacing the roles of repetitive sequences pAs1, pSc119.2, pTa-535, pTa71, CCS1, and pAWRC.1 for FISH analysis // J. Appl. Genet. 2014. Vol. 55. N 3. P. 313–318.
4. Fu S.L., Chen L., Wang Y.Y., Li M., Yang Z.J., Qiu L., Yan B.J., Ren Z.L., Tang Z.X. Oligonucleotide probes for ND-D-FISH analysis to identify rye and wheat chromosomes // Sci. Rep. 2015. Vol. 5: 10552.
5. Xiao Z., Tang S., Qiu L., Tang Z., Fu S. Oligonucleotides and ND-FISH displaying different arrangements of tandem repeats and identification of *Dasypyrum villosum* chromosomes in wheat backgrounds // Molecules. 2017. Vol. 22. N 6: 973.
6. Badaeva E.D., Amosova A.V., Goncharov N.P., Macas J., Ruban A.S., Grechishnikova I.V., Zoshchuk S.A., Houben A. A set of cytogenetic markers allows the precise identification of all A-genome chromosomes in diploid and polyploidy wheat // Cytogenet. Genome Res. 2015. Vol. 146. N 1. P. 71–79.
7. Li G.R., Gao D., Zhang H.G., Li J.B., Wang H.J., La S.X., Ma J.W., Yang Z.J. Molecular cytogenetic characterization of *Dasypyrum breviaristatum* chromosomes in wheat background revealing the genomic divergence between *Dasypyrum* species // Mol. Cytogenet. 2016. Vol. 9. N 1: 6.
8. Du P., Zhuang L.F., Wang Y.Z., Yuan Q., Wang D.R., Dawadondup, Tan L.J., Shen J., Xu H.B., Zhao H. Development of oligonucleotides and multiplex probes for quick and accurate identification of wheat and *Thinopyrum bessarabicum* chromosomes // Genome. 2017. Vol. 60. N 2. P. 93–103.
9. Puterova J., Razumova O., Martinek T., Alexandrov O., Divashuk M., Kubat Z., Hobza R., Karlov G., Kejnovsky E. Satellite DNA and transposable elements in seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*), a dioecious plant with small Y and large X chromosomes // Genome Biol. Evol. 2017. Vol. 9. N 1. P. 197–212.
10. Xin H., Zhang T., Han Y., Wu Y., Shi J., Xi M., Jiang J. Chromosome painting and comparative

physical mapping of the sex chromosomes in *Populus tomentosa* and *Populus deltoides* // *Chromosoma*. 2018. Vol. 127. N 3. P. 313–321.

11. Tang S., Tang Z., Qiu L., Yang Z., Li G., Lang T., Zhu W., Zhang J., Fu S. Developing new Oligo probes to distinguish specific chromosomal segments and the A, B, D genomes of wheat (*Triticum aestivum* L.) using ND-FISH // *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 9: 1104.

12. Jiang M., Xaio Z.Q., Fu S.L., Tang Z.X. FISH karyotype of 85 common wheat cultivars/lines displayed by ND-FISH using oligonucleotide probes // *Cereal Res. Commun.* 2017. Vol. 45. N 4. P. 549–563.

13. Kirov I.V., Kiseleva A.V., Van Laere K., Van Roy N., Khrustaleva L.I. Tandem repeats of *Allium fistulosum* associated with major chromosomal landmarks // *Mol. Genet. Genomics*. 2017. Vol. 292. N 2. P. 453–464.

14. Alexandrov O.S., Karlov G.I. Molecular cytogenetic analysis and genomic organization of major DNA repeats in castor bean (*Ricinus communis* L.) // *Mol. Genet. Genomics*. 2016. Vol. 291. N 2. P. 775–787.

15. Komuro S., Endo R., Shikata K., and A. Kato. Genomic and chromosomal distribution patterns of various repeated DNA sequences in wheat revealed by a fluorescence *in situ* hybridization procedure // *Genome*. 2013. Vol. 56. N 3. P. 131–137.

16. 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. Vol. 54. N 2. P. 151–159.

17. Iwata-Otsubo A., Radke B., Findley S., Abernathy B., Vallejos C.E., Jackson S.A. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)-based karyotyping reveals rapid evolution of centromeric and subtelomeric repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*) and relatives // *G3: Genes, Genom., Genet.* 2016. Vol. 6. N 4. P. 1013–1022.

18. Badaeva E.D., Ruban A.S. Evolution of the S-genomes in *Triticum-Aegilops* alliance: evidences from chromosome analysis // *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 9: 1756.

19. Badaeva E.D., Ruban A.S., Aliyeva-Schnorr L., Municio C., Hesse S., Houben A. *In situ* hybridization to plant chromosomes // *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Springer Protocols Handbooks / Ed. T. Liehr. Berlin, Heidelberg: Springer, 2017. P. 477–494.

20. Lang T., Li G., Wang H., Yu Z., Chen Q., Yang E., Fu S., Tang Z., Yang Z. Physical location of tandem repeats in the wheat genome and application for chromosome identification // *Planta*. 2018. Vol. 249. N 3. P. 663–675.

Поступила в редакцию 17.12.2018 г.

После доработки 17.04.2019 г.

Принята в печать 23.04.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

SOME PECULIARITIES OF APPLICATION OF DENATURATIVE AND UNDENATURATED D-FISH METHODS ON CHROMOSOMES OF CEREALS

V.M. Kuznetsova^{1,2}, O.V. Razumova^{1,3}, G.I. Karlov^{1,2}, T.X. Dang², P.Y. Kroupin^{1,2}, M.G. Divashuk^{1,2,*}

¹Laboratory of Applied Genomics and Crop Breeding, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya str. 42, Moscow, 127550, Russia;

²Center for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University – MTAA, Timiryazevskaya str. 49, Moscow, 127550, Russia;

³Laboratory of Molecular Systematics, N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya str. 4, Moscow, 127276, Russia

*e-mail: divashuk@gmail.com

Non-denaturing fluorescent *in situ* hybridization (ND FISH) is a convenient method of cytogenetic research. Compared to the standard method, ND FISH is fast and easy to perform, requires less time, reagents and tools, so it is gaining increasing popularity among different groups of scientists and used to accomplish various scientific tasks. However, when using this method to visualize the chromosomes of wheat and its wild relatives, we faced some peculiarities of its application when

oligonucleotide probes are used. In this paper, we compare three following methods, two different versions of the denaturation method and the denaturation FISH. In the standard procedure and its modifications, chromosomes are treated with formamide at high temperature that results in the denaturation of supercoiled DNA of plant chromosomes. In the non-denaturing FISH, this step is omitted that makes it possible to keep the native chromosome structure and, thus, is more time and cost effective. In our work, all methods demonstrated their efficiency. Non-denaturing FISH is characterized by ease and convenience, but less reproducibility in a series of experiments. The standard protocol and its modifications are most stable and reliable, but negatively affect chromosome morphology. In successive hybridizations on the same slide (sequential FISH), we recommend a combination of these methods, with primary testing using a standard protocol and subsequent hybridization using the ND-FISH method.

Keywords: *FISH, ND FISH, non-denatured in situ hybridization, molecular cytogenetics methods, triticealeon*

Сведения об авторах

Кузнецова Виктория Максимовна — мл. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ВНИИСБ; лаборант-исследователь центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-70-01; e-mail:

vika-kuz367@yandex.ru

Разумова Ольга Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ВНИИСБ; науч. сотр. лаборатории молекулярной систематики ГБС им. Н.В. Цицина РАН. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail:

razumovao@gmail.com

Карлов Геннадий Ильич — докт. биол. наук, проф., член-корр. РАН, директор ВНИИСБ. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: *karlov@iab.ac.ru*

Данг Тхи Суан — магистр РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-70-01; e-mail: *hixi.dang91@gmail.com*

Крупин Павел Юрьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ ВНИИСБ; ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-70-01; e-mail: *pavelkroupin1985@gmail.com*

Дивашук Михаил Георгиевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ВНИИСБ; ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8-499-977-70-01; e-mail: *divashuk@gmail.com*