

УДК 575.222.7:575.853'3:576.316.7

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ГЕНОМНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ *in situ* (GISH) ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ГЕНОМОВ ТЕТРАПЛОИДНЫХ И ГЕКСАПЛОИДНЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦЫ¹

© 2009 г. А. В. Амосова, Е. Д. Бадаева, О. В. Муравенко, А. В. Зеленин

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

119991 Москва, ул. Вавилова, д. 32

E-mail: chrom@imb.ru

Поступила в редакцию 24.04.08 г.

Окончательный вариант получен 15.10.08 г.

Предложена усовершенствованная модификация метода геномной гибридизации *in situ* (GISH), позволяющая получить четкое и воспроизводимое разделение близкородственных геномов как тетраплоидных, так и гексаплоидных видов пшеницы, основанная на использовании предварительного отжига меченых ДНК-проб и предгибридизации хромосомных препаратов с блокирующей ДНК для улучшения дифференциации геномов. Метод был использован для анализа межгеномных транслокаций 6A:6B и 1A:6B, выявленных у образцов тетраплоидной пшеницы IG46147 и IG116188 *Triticum dicoccoides* с помощью С-бэндинга. Были уточнены структуры перестроенных хромосом в двух вариантах транслокаций и определены точки разрывов на хромосомных плечах. Обсуждается возможность использования разработанного варианта метода GISH для изучения реорганизации геномов при видообразовании аллополиплоидных видов растений в процессе эволюции.

Ключевые слова: геномная гибридизация *in situ*, разделение близкородственных геномов пшеницы, межгеномные транслокации.

Межвидовая гибридизация и полиплоидия считаются факторами, лежащими в основе эволюции растений. Для понимания процессов видообразования, определения филогенетического родства между таксономическими группами растений, особенно аллополиплоидами, особое значение приобретает сравнение их геномов с геномами предполагаемых предков. Одним из самых известных и значимых аллополиплоидов является пшеница, которая относится к наиболее древним видам культурных растений, возделываемых человеком уже более 10 тыс. лет. Предполагают, что тетраплоидные виды пшеницы образовались около 500 тыс. лет назад, тогда как гексаплоидные формы дивергировали сравнительно недавно: их возраст оценивается приблизительно в 8–10 тыс. лет (Feldman, 2001). Твердая и мягкая пшеница являются сложными аллополиплоидами, образовавшимися в результате естественной гибридизации с последующим удвоением числа хромосом.

С помощью геномного анализа было выяснено, что один геном (A) является общим для всех видов пшениц; у твердой и мягкой пшеницы – два общих генома (A и B) и, наконец, у мягкой присутствует еще геном D. Таким образом, геномная формула диплоидной пшеницы выглядит следую-

щим образом: у однозернянки – AA, у твердой – ВВАА, у мягкой – ВВААDD (Kihara, 1975). Предком A-генома полиплоидных пшениц послужил дикорастущий диплоидный вид *Triticum urartu* (Конарев и др., 1974; Dvorak et al., 1988). Точный донор B-генома пшеницы до сих пор не найден, однако считается, что из ныне существующих видов злаков наиболее близким к предполагаемому предку полиплоидной пшеницы является *Aegilops speltoides* (Бадаева, 2001; Sarkar, Stebbins, 1956). Хорошо известно, что D-геном мягкой пшеницы был унаследован от дикорастущего вида *Aegilops tauschii* (McFadden, Sears, 1946; Kihara, 1975; Dvorak et al., 1998).

Сложности точной идентификации доноров геномов тетраплоидной пшеницы обусловлены тем, что объединение двух неродственных геномов в одном ядре в процессе полиплоидизации привело к их значительным изменениям относительно исходных. Так, появление тетраплоидной пшеницы сопровождалось комплексной транслокацией 4A-5A-7B и перичентрической инверсией хромосомы 4A (Naranjo et al., 1987; Jiang, Gill, 1994; Devos et al., 1995). Помимо хромосомных aberrаций гибридизация может вызывать реорганизацию различных типов последовательностей ДНК в геноме полиплоида. На примере искусственно синтезированных аллополиплоидов

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 08-04-00302-а, 08-08-00391-а).

Triticum – Aegilops было продемонстрировано, что уже в первых поколениях гибридов происходит неслучайная элиминация или амплификация определенных классов последовательностей из родительских геномов (Feldman et al., 1997; Liu et al., 1998; Ozkan et al., 2001; Shaked et al., 2001; Kashkush et al., 2002). С другой стороны, длительная совместная эволюция привела к сближению А- и В-геномов за счет обмена последовательностями и появления новых общих типов повторов.

Геномная гибридизация *in situ* (GISH) – вариант метода гибридизации *in situ*, разработанный в начале 1990-х гг. для изучения полиплоидных видов растений (Anamthawat-Jonsson et al., 1990; Heslop-Harrison, Schwarzacher, 1996). В качестве зонда в GISH используют геномную ДНК одного или двух (в случае гексаплоидов) родительских видов. Метод широко используется для разделения хромосом разных геномов у полиплоидных видов, а также при анализе межгеномных замещений или транслокаций. Он оказывается особо информативным и в том случае, когда хромосомные перестройки не удается выявить методами дифференциального окрашивания или флуоресцентной гибридизации *in situ*.

GISH успешно используется при анализе гибридов, содержащих неродственные геномы, например, ржи и пшеницы (Murata et al., 1992; Sánchez-Morán et al., 1999), ячменя и пшеницы (Molnár-Láng et al., 2000), пшеницы и эгилопса (Iqbal et al., 2000b). Опубликованы сведения и об успешном разделении геномов тетраплоидной (Jiang, Gill, 1993) и гексаплоидной пшеницы (Mukai, Nakahara, 1993). Тем не менее исследователи до сих пор сталкиваются со значительными трудностями при разделении геномов, что обусловлено наличием в них общих повторяющихся последовательностей ДНК, появившихся в процессе длительной совместной эволюции геномов пшеницы в одном ядре (Iqbal et al., 2000a; Schwarzacher, Heslop-Harrison, 2000). В то же время при исследовании обширной коллекции образцов дикорастущей тетраплоидной пшеницы *Triticum dicoccoides* методом С-бэндинга было выявлено множество вариантов межгеномных транслокаций хромосом, локализацию точек разрывов которых оказалось сложно определить по рисункам дифференциального окрашивания (Бадаева, 2000).

Цель нашей работы – разработка такой модификации метода GISH, которая позволила бы четко разделить близкородственные А-, В- и D-геномы пшеницы для выявления межгеномных хромосомных перестроек.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования служили образцы тетраплоидной пшеницы *T. dicoccoides*

IG46147 и IG116188, содержащие транслокации 6A:6B и 1A:6B, и образец к-152 гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum*. Образцы получены из Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР, СПб.), а также из коллекции Международного центра сельскохозяйственных исследований в засушливых районах (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, ICARDA, Сирия).

Приготовление и С-окраску хромосомных препаратов проводили по описанной ранее методике (Badaeva et al., 1994) с небольшими модификациями.

Хромосомы пшеницы классифицировали в соответствии со стандартной генетической номенклатурой (Badaeva et al., 1990; Gill, 1991).

Гибридизация *in situ*. Для геномной гибридизации *in situ* разработана следующая модификация метода GISH, позволяющая получить четкое разделение хромосом разных геномов. Геномную ДНК выделяли СТАВ-методом (Маниатис и др., 1984) из зеленых листьев и стеблей предполагаемых родительских видов (доноров А-, В- и D-геномов) твердой и мягкой пшеницы, т. е. диплоидной пшеницы-однозернянки *Triticum boeoticum*, содержащей А-геном, и эгилопсов *Ae. speltooides* (В-геном) и *Ae. tauschii* (D-геном). ДНК *T. boeoticum* метили биотином, а ДНК *Ae. tauschii* – дигоксигенином с помощью ник-трансляции в соответствии с протоколом фирмы-производителя (“Roche”, Германия). ДНК *Ae. speltooides*, обработанную с помощью ультразвука до получения фрагментов размером около 500 н.п., использовали для блокирования кросс-гибридизации. Размер фрагментов контролировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Приготовление проб. Меченую геномную ДНК (30–40 нг) смешивали с равным количеством блокирующей ДНК и растворяли в 15 мкл гибридизационной смеси (10%-ный декстран сульфат, 50%-ный формамид, 1%-ный Tween, 2xSSC). Полученную смесь денатурировали при 85°C в течение 5 мин, быстро охлаждали на льду и помещали в термостат на 2 ч при температуре 37°C для предварительного отжига.

Гибридизация проб на препаратах. Хромосомные препараты денатурировали в 70%-ном растворе формамида (2xSSC) при 74°C в течение 3 мин, проводили через серию холодных спиртов, а затем высушивали на воздухе.

Для получения более четкого разделения геномов при GISH проводили предгибридизацию препаратов с блокирующей ДНК, для чего последнюю (30–40 нг) растворяли в гибридизационной смеси в общем объеме 15 мкл, денатурировали при 85°C 5 мин, а затем быстро охлаждали на льду. Полученную смесь наносили на препарат, накрывали покровным стеклом и помещали во влажной камере в термостат на 2 ч при 37°C.

С препаратов удаляли покровное стекло и при 37°C проводили гибридизацию с пробой ДНК, прошедшей предварительный отжиг. Через 16–18 ч препараты дважды отмывали при 44°C в растворах 0.1xSSC и 2xSSC (по 10 мин в каждом), затем 5 мин при комнатной температуре в 2xSSC, после чего препараты помещали в раствор 4xSSC, содержащий 0.5%-ный Tween (4xSSCT). После этого препараты обрабатывали раствором 4xSSCTM (0.05%-ное обезжиренное сухое молоко, растворенное в 4xSSCT) при 37°C в течение 20 мин.

Сайты гибридизации у тетраплоидных видов пшеницы выявляли при 37°C с помощью системы для выявления биотина (“Vector lab.”, Великобритания): 1) флуоресцеин конъюгированного авидина, 2) биотинилированного антиавидина и 3) флуоресцеин конъюгированного авидина.

Сайты гибридизации у гексаплоидных видов пшеницы выявляли также при 37°C с помощью соответствующей системы для выявления биотина и дигоксигенина: 1) флуоресцеин конъюгированного антидигоксигенина (“Roche”, Германия) и Техасского красного (“Vector lab.”, Великобритания), затем 2) кроличьего антифлуоресцеина (“DAKO”, Дания) и биотинилированного антиавидина (“Vector lab.”, Великобритания), а после этого 3) флуоресцеин конъюгированных свиных антикроличьих антител (“DAKO”, Дания) и Техасского красного. Каждую процедуру проводили в течение 30 мин после трехкратной отмывки в растворе 4xSSCT.

Хромосомные препараты обезвоживали, проводя через серию холодных спиртов, высушивали на воздухе и заключали в краситель DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole), (“Serva”, Германия), растворенный в концентрации 2 мкг/мл в среде Vectashield (“Vector lab.”, Великобритания). Препараты анализировали на микроскопе Olympus BX61c использованием CCD-камеры (“Cool Snap”, США). Изображения хромосом обрабатывали с помощью стандартных компьютерных методов улучшения изображения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенная в настоящей работе модификация метода геномной гибридизации *in situ* (GISH) позволила получить четкое и воспроизводимое разделение близкородственных геномов как в тетраплоидных, так и в гексаплоидных видах пшеницы (рис. 1, 2). Это стало возможным благодаря использованию предварительного отжига меченых проб ДНК и проведению предгибридизации хромосомных препаратов с использованием донора ДНК одного из геномов пшеницы в качестве блокирующей немеченой ДНК. В нашем случае использовали ДНК *Ae. speltoides* как предполагаемого донора В-генома пшеницы, поскольку

именно такая комбинация меченых проб ДНК (гибридирующихся с А- и D-геномами) и блокирующей ДНК давала наиболее контрастное разделение хромосом. Использование предварительного отжига проб и предгибридизации препаратов позволили максимально снизить затрудняющее дифференциацию геномов влияние высокоповторяющихся последовательностей ДНК, которые в большем количестве представлены в геноме раттений, и способствовали подавлению кросс-гибридизации.

Поскольку кросс-гибридизация геномных проб ДНК у близкородственных видов (геномов) проявляется в высокой степени (Heslop-Harrison, Schwarzacher, 1996; Schwarzacher, Heslop-Harrison, 2000) и является одной из главных проблем при разделении геномов, указанные процедуры оказались очень полезными.

Концентрация блокирующей ДНК при проведении предгибридизации и предварительного отжига пробы была одним из параметров, влияющих на четкость разделения геномов пшеницы. В нашей модификации дифференциация геномов происходила с использованием меченой пробы и блокирующей ДНК в равных количествах. Увеличивая концентрацию блокирующей ДНК в два-три раза, можно при необходимости варьировать яркость флуоресцентного мечения хромосом для более четкого разделения геномов.

На перспективность использования предварительного отжига проб ДНК при GISH для улучшения геномной дифференциации указывали также и другие авторы (Ananthawat-Jonsson, Reader, 1995). Позднее Икбал с соавторами (Iqbal et al., 2000b, 2002) использовали комбинацию предварительного отжига пробы и предгибридизационного блокирования для детекции хромосом N-генома эгилопа в пшенично-эгилопсных транслокационных линиях.

В нашей модификации метода GISH использование 50%-ного формамида при приготовлении пробы в качестве одного из компонентов гибридационной смеси позволило снизить температуру проведения предгибридизации и гибридизации на 39 и 37°C соответственно по сравнению с указанной методикой (Iqbal et al., 2000b, 2002). Кроме того, эти авторы вынуждены были использовать более высокие концентрации блокирующей ДНК при предгибридизации и проводить денатурацию пробы при более высокой температуре. Таким образом, более мягкие условия гибридизации позволили нам не только получить четкое разделение всех геномов пшеницы, но и сохранить высокое качество хромосомных пластинок.

Разработанный метод был использован для анализа межгеномных транслокаций 6A:6B и 1A:6B, выявленных у образцов IG46147 и IG116188 *T. dicoccoides* с помощью С-бэндинга (рис. 1, а, б). GISH показал, что обе транслокации

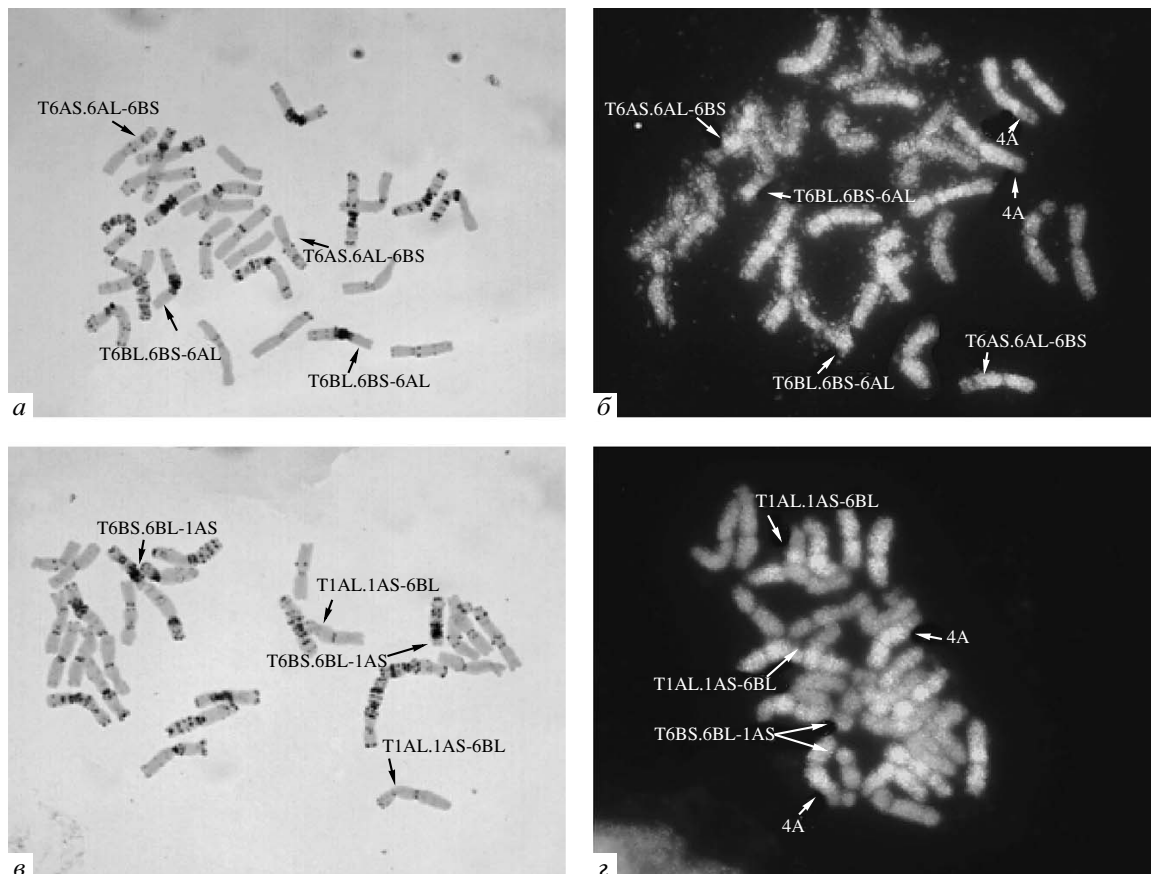


Рис. 1. Межгеномная транслокация 6A:6B, выявленная у образца IG46147 *T. dicoccoides* с помощью С-бэндинга (а) и GISH (б), а также межгеномная транслокация 1A:6B, выявленная у образца IG116188 *T. dicoccoides* с помощью С-бэндинга (в) и GISH (г) (→). Видны светлые хромосомы А-генома (б, г), меченные биотином с использованием в качестве пробы геномной ДНК *T. boeoticum*. GISH уточняет структуру перестроенных хромосом в транслокациях и определяет точки разрывов на хромосомных плечах. Наблюдается видоспецифичная транслокация 4A-7B (обозначена как 4A).

являются реципрокными. В случае транслокации Т6А:6В точки разрывов располагались в середине длинного плеча хромосомы 6А и в коротком плече хромосомы 6В вблизи района вторичной перетяжки (рис. 1, в). Дистальная часть короткого плеча, включая спутник, была перенесена в длинное плечо хромосомы 6А, а дистальная половина длинного плеча 6А – в короткое плечо хромосомы 6В.

По результатам С-бэндинга было невозможно установить, является ли транслокация 1А:6В реципрокной или же произошел однонаправленный перенос фрагмента длинного плеча 6В в короткое плечо хромосомы 1А. С помощью геномной гибридизации *in situ* было показано, что обмен участками хромосом был взаимным, однако в длинное плечо 6В был перенесен лишь небольшой участок хромосомы 1А, тогда как транслоцированный фрагмент в хромосоме 1А составлял свыше 2/3 длины плеча (рис. 1, г). Усовершенствованный нами вариант метода GISH позволил уточнить структуры перестроенных хромосом в

двух вариантах транслокаций и определить точки разрывов на хромосомных плечах.

Вариант метода GISH, разработанный для изучения тетраплоидных видов пшеницы, был также использован для анализа структуры генома гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* (рис. 2). Геномные ДНК *T. boeoticum* и *Ae. tauschii* метили биотином и диоксигенином соответственно. Геномную ДНК *Ae. speltoides* использовали как блокирующую немеченую ДНК. Было установлено, что данный образец содержит видоспецифичную транслокацию 4А-7В (4А – на рис. 2), характерную для всех видов пшеницы группы эммер, но никаких дополнительных перестроек выявлено не было. Следует отметить, что предлагаемый нами вариант метода позволил получить достаточно четкое разделение хромосом А-, В-, D-геномов пшеницы (рис. 2, а-в).

Таким образом, наша модификация метода может быть использована для разделения близкородственных геномов у полиплоидов, а также для выявления и точной локализации точек разрывов хромосом в межгеномных перестройках. Это представляет значительный интерес не толь-

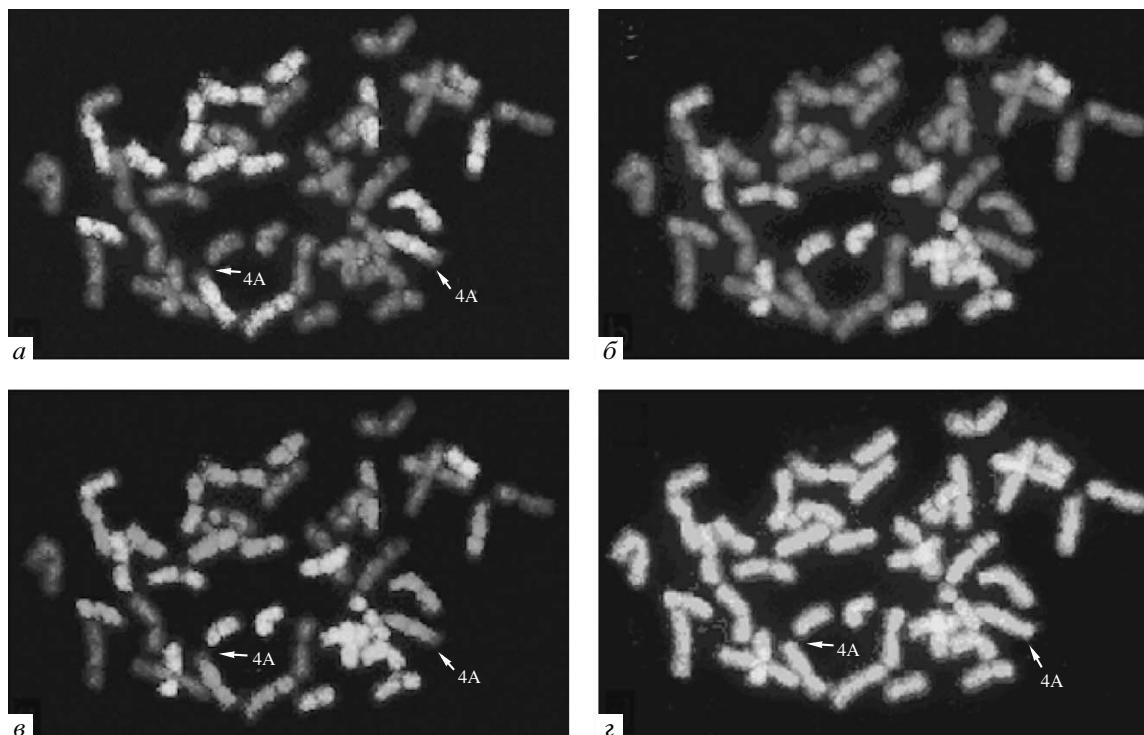


Рис. 2. Дифференциация А-, В- и D-геномов гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* (образец к-152) с помощью GISH: *а* – светлые хромосомы А-генома, меченные биотином с использованием в качестве пробы геномной ДНК *T. boeotiscum*; наблюдается видоспецифичная транслокация 4А-7В (обозначена как 4А); *б* – светлые хромосомы D-генома, меченные дигоксигенином с использованием в качестве пробы геномной ДНК *Ae. tauschii*; *в* – серые хромосомы А-генома, светлые хромосомы D-генома, темные хромосомы В-генома (в качестве блокирующей немеченой пробы использовали геномную ДНК *Ae. speltoides*); *г* – все хромосомы, окрашенные DAPI.

ко для пшеницы, но и для других видов культурных и дикорастущих растений аллополиплоидного происхождения. Разработанный вариант метода GISH является наглядным и точным способом изучения реорганизации геномов при видообразовании аллополиплоидных видов растений в процессе эволюции. Представляется перспективным использование этого метода для изучения хромосомных перестроек, возникающих в каллусных культурах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бадаева Е.Д.* Эволюция геномов пшениц и их дикорастущих сородичей: молекулярно-генетическое исследование: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: ИМБ РАН, 2000. 48 с.
- Бадаева Е.Д.* Хромосомный анализ при исследовании происхождения В-(G-)геномов полиплоидных пшениц // Биол. мембраны. 2001. Т. 18. № 3. С. 216–229.
- Конарев А.В., Гаврилюк И.П., Мигушова Э.Ф.* Дифференциация диплоидных пшениц по данным иммунохимического анализа глиаина // Докл. ВАСХНИЛ. 1974. Т. 6. С. 12–14.
- Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Д.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
- Anamthawat-Jonsson K., Schwarzacher T., Leitch A.R. et al.* Discrimination between closely related Triticeae species using genomic DNA as a probe // Theor. Appl. Genet. 1990. V. 79. P. 721–728.
- Anamthawat-Jonsson K., Reader S.M.* Pre-annealing of total genomic DNA probes for simultaneous genomic *in situ* hybridization // Genome. 1995. V. 38. P. 814–816.
- Badaeva E.D., Sozinova L.F., Badaev N.S. et al.* “Chromosomal passport” of *Triticum aestivum* L. em Thell. cv. Chinese Spring and standardization of chromosomal analysis of cereals // Cereal Res. Comm. 1990. V. 18. № 4. P. 273–281.
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S. et al.* Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* // Plant Syst. Evol. 1994. V. 192. P. 117–145.
- Devos K.M., Dubkovsky J., Dvorak J. et al.* Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on recombination // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 91. P. 282–288.
- Dvorak J., Mcguire P.E., Cassidy B.* Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences // Genome. 1988. V. 30. P. 680–689.
- Dvorak J., Luo M.C., Yang Z.L. et al.* The structure of the *Aegilops tauschii* gene pool and the evolution of hexaploid wheat // Theor. Appl. Genet. 1998. V. 97. P. 657–670.

- Feldman M.* Origin of cultivated wheat // The world wheat book. A history of wheat breeding / Eds Bonjean A.P., Angus W.J. et al. L.: Tec. & Doc / Intersept Ltd., 2001. P. 3–56.
- Feldman M., Liu B., Segal G. et al.* Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes // *Genetics*. 1997. V. 147. № 3. P. 1381–1387.
- 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. P. 830–839.
- Heslop-Harrison J.S., Schwarzacher T.* Genomic southern and *in situ* hybridization // *Methods in genome analysis in plants* / Ed. Jauhar P.P. N.Y.: Boca Ration; CRC Press, 1996. P. 163–180.
- Iqbal N., Reader S.M., Caligari P.D.S. et al.* The production and characterization of recombination between chromosome 3N of *Aegilops uniaristata* and chromosome 3A of wheat // *Heredity*. 2000a. V. 84. № 4. P. 487–492.
- Iqbal N., Reader S.M., Caligari P.D.S. et al.* Characterization of *Aegilops uniaristata* chromosomes by comparative DNA marker analysis and repetitive DNA sequence *in situ* hybridization // *Theor. Appl. Genet.* 2000b. V. 101. P. 1173–1179.
- Iqbal N., Reader S.M., Caligari P.D.S. et al.* An improved genomic *in situ* hybridization (GISH) method to differentiate chromosomes from closely related genomes // *Pakistan J. Biol. Sci.* 2002. V. 5. № 8. P. 869–870.
- Jiang J., Gill B. S.* Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis // *Genome*. 1993. V. 36. P. 792–795.
- Jiang J., Gill B. S.* Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the diphyletic origin of polyploid wheats // *Chrom. Res.* 1994. V. 2. № 1. P. 59–64.
- Kashkush K., Feldman M., Levy A.A.* Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid // *Genetics*. 2002. V. 160. № 4. P. 1651–1659.
- Kihara H.* Origin of cultivated plants with special reference to wheat // *Seiken Ziho*. 1975. № 25–26. P. 1–24.
- Liu B., Vega J.M., Segal G. et al.* Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploid of *Triticum* and *Aegilops*. I. Changes in low-copy non-coding DNA sequences // *Genome*. 1998. V. 41. P. 272–277.
- McFadden E.S., Sears E.R.* The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives // *J. Heredity*. 1946. V. 37. P. 81–107.
- Molnár-Láng M., Linc G., Friebe B.R. et al.* Detection of wheat-barley translocations by genomic *in situ* hybridization in derivatives of hybrids multiplied *in vitro* // *Euphytica*. 2000. V. 112. № 2. P. 117–123.
- Mukai Y., Nakahara Y.* Simultaneous discrimination of three genomes in hexaploid wheat by multicolour fluorescent *in situ* hybridization using genomic and highly repeated DNA probes // *Genome*. 1993. V. 36. P. 489–494.
- Murata M., Nakata N., Yasumuro Y.* Origin and molecular structure of a midge chromosome in a common wheat carrying rye cytoplasm // *Chromosoma*. 1992. V. 102. № 1. P. 27–31.
- Naranjo T., Roca A., Goicoechea P.G. et al.* Arm homoeology of wheat and rye chromosomes // *Genome*. 1987. V. 29. P. 873–882.
- Ozkan H., Levy A.A., Feldman M.* Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group // *Plant Cell*. 2001. V. 13. № 8. P. 1735–1747.
- Sánchez-Morán E., Benavente E., Orellana J.* Simultaneous identification of A, B, D and R genomes by genomic *in situ* hybridization in wheatrye derivatives // *Heredity*. 1999. V. 83. № 3. P. 249–252.
- Sarkar P., Stebbins G.L.* Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat // *Am. J. Bot.* 1956. V. 43. P. 297–304.
- Schwarzacher T., Heslop-Harrison P.* *Practical in situ hybridization*. Bath; Oxford: BIOS Sci. Publ. Ltd., 2000. 199 p.
- Shaked H., Kashkush K., Ozkan H. et al.* Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat // *Plant Cell*. 2001. V. 13. № 8. P. 1749–1759.

An Improved Method of Genomic *in situ* Hybridization (GISH) for Distinguishing Closely Related Genomes of Tetraploid and Hexaploid Wheat Species

A. V. Amosova, E. D. Badaeva, O. V. Muravenko, and A. V. Zelenin

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

e-mail: chrom@imb.ru

Abstract—An improved modification of genomic *in situ* hybridization (GISH) was proposed. It allows clear and reproducible discrimination between closely related genomes of both tetraploid and hexaploid wheat species due to preannealing of labeled DNA probes and prehybridization of chromosomal samples with blocking DNA. The method was applied to analyze intergenomic translocations 6A:6B and 1A:6B identified in the IG46147 and IG116188 samples of tetraploid wheat *Triticum dicoccoides* by C-banding. The structure of the rearranged chromosomes was defined for two translocation variants, and the breakpoints were identified on the chromosome arms. Possible application of the developed GISH variant to study genome reorganizations during speciation of allopolyploid plants in evolution is discussed.

Key words: genomic *in situ* hybridization, discrimination of closely related wheat genomes, intergenomic translocations.