

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОВ И ГЕНОМОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Е.К. Хлесткина

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

В последние десятилетия с введением в генетику растений молекулярных методов исследования появилось представление о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе наследования и формирования полезных признаков у растений, были составлены хромосомные карты наиболее важных сельскохозяйственных культур с нанесенными на них молекулярными маркерами и генами, произошло внедрение молекулярных методов в селекционно-генетические исследования, возникло понятие молекулярной паспортизации сортов. Помимо очевидного практического значения применение молекулярных методов позволило существенно расширить и фундаментальные исследования в области генетики и эволюции растений. В настоящем обзоре рассматриваются основные современные методы генетики растений и области их применения.

Ключевые слова: геном высших растений, клонирование генов, молекулярные маркеры, транскрипция генов.

Представления о структуре и функциях генома растений и о механизмах наследования и формирования признаков, сложившиеся к 80-м гг. предыдущего столетия, основывались на результатах исследований методами классического генетического и цитогенетического анализа, что позволяло определять характер наследования качественных признаков, устанавливать хромосомное число у разных видов растений, в отдельных случаях определять, какая хромосома контролирует тот или иной признак, какие гены являются сцепленными между собой, выявлять крупные перестройки в геноме одних видов по сравнению с другими, определять хромосомный состав у межвидовых и межродовых гибридов.

Большой размер и сложная организация генома растений не позволяли с помощью существующих методов исследования составлять насыщенные хромосомные карты, неизученными оставались генетические основы количественных признаков, а для выявленных генов, контролирующих качественные признаки, затруднительным представлялось вы-

яснение функционального назначения данных генов. Существовавшая на тот момент система биохимических маркеров (маркеры на основе анализа белкового полиморфизма) позволила несколько улучшить ситуацию с построением хромосомных карт у растений, однако возможности данного метода ограничивались низким уровнем внутривидового полиморфизма и низкой частотой встречаемости соответствующих локусов в геноме растений.

Внедрение методов клонирования, гибридизации и секвенирования геномной ДНК и кДНК растений и дальнейшее появление метода ПЦР (полимеразная цепная реакция) и ДНК-чипов определили начиная с 1980-х гг. и по настоящее время бурное развитие генетики растений по таким направлениям, как исследование структурно-функциональной организации генов и повторяющихся последовательностей ДНК растений, разработка ДНК-маркеров и применение их для составления насыщенных хромосомных карт, оценки генетического разнообразия и решения филогенетических задач.

¹ Статья написана по материалам публичной лекции, прочитанной в Институте цитологии и генетики СО РАН. Презентация и видеозапись лекции: http://www.bionet.nsc.ru/asp/?page_id=86.

Методы анализа полиморфизма ДНК: основные типы молекулярных маркеров и область их применения

Молекулярные маркеры представляют собой генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. К ним применимы термины классической генетики, такие, как локус, аллель, доминантный и кодоминантный тип наследования. Аллели маркерных локусов представляют собой различные формы (нуклеотидные последовательности, отличающиеся по длине и/или по нуклеотидным заменам) одного и того же маркера, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом. Если метод анализа маркера позволяет выявлять оба аллеля, говорят о кодоминантном типе наследования данного маркера, если выявляется только один аллель – о доминантном наследовании.

В настоящее время существуют огромное разнообразие методов анализа полиморфизма ДНК и множество комбинаций данных методов, что затрудняет создание единой более или менее подробной классификации ДНК-маркеров. При изучении генома растений наиболее часто используются следующие подходы: RFLP, CAPS, STS, RAPD, SCAR, AFLP, SSAP, SSR, ISSR, DAaT и SNP (табл. 1). По основному методу, на котором строится тот или иной подход к анализу полиморфизма ДНК, молекулярные маркеры можно разделить на маркеры, основанные на блот-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипах. При этом в каждой из трех групп маркеры разделяются на монолокусные и мультилокусные. Все мультилокусные маркеры объединяют еще и под общим названием «методы геномного фингерпринтинга». Монолокусные маркеры наследуются, как правило, по кодоминантному типу, мультилокусные – по доминантному (табл. 1) (Хлесткина, Салина, 2006; Landjeva *et al.*, 2007).

Для адекватного подбора маркеров с целью решения той или иной генетической задачи необходимо учитывать такие критерии, как цель использования, возможность сопоставления полученных результатов с данными других исследователей, материальные и временные затраты, необходимые для проведения исследования с выбранной группой маркеров, уровень полиморфизма и возможность автоматизации процесса (рис. 1). Основные характеристики

маркеров служат для отбора подходящего типа маркеров в зависимости от указанных выше критериев. Так, кодоминантные монолокусные маркеры, характеризующие индивидуальный локус, часто используются для популяционно-генетических исследований, картирования генов и геномов, сравнительного картирования и построения консенсусных карт в пределах одного рода (SSR, RFLP) или более крупных таксономических единиц (RFLP). Геномный фингерпринтинг применяется чаще всего при популяционном анализе видов, геном которых практически не изучен. Кроме того, такие методы геномного фингерпринтинга, как AFLP и DAaT, эффективны для насыщения генетических карт локусами молекулярных маркеров (табл. 1) (Хлесткина, Салина, 2006).

Следующий пример иллюстрирует, насколько эффективно применение молекулярных маркеров позволило продвинуться в картировании генома растений: первая молекулярно-генетическая карта, построенная в 1991 г. для пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.), содержала в 1,5 раза больше локусов и была в 1,2 раза длиннее прежней классической генетической карты, которая являлась результатом трудов многих исследователей в течение нескольких десятилетий.

Молекулярные маркеры нашли свое применение и в селекционно-генетических исследованиях, появились понятия «селекция с помо-

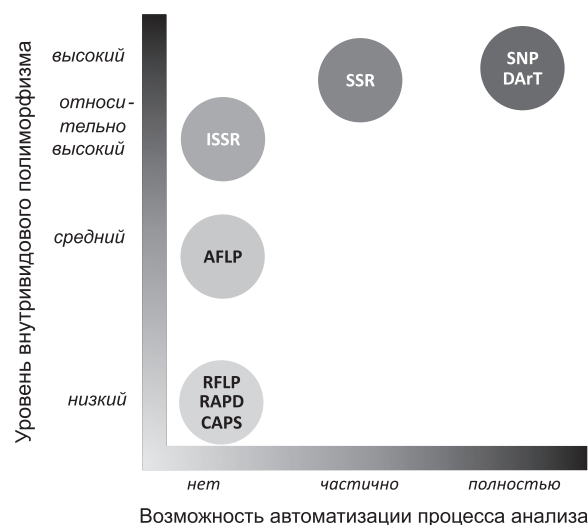


Рис. 1. Уровень внутривидового полиморфизма и возможность автоматизации анализа различных типов ДНК-маркеров.

Таблица 1

Классификация и сравнительные характеристики монолокусных и мультилокусных ДНК-маркеров

Классификация	Монолокусные маркеры	Мультилокусные маркеры
Классификация		
Методы, основанные на блот-гибридизации	RFLP (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (Botstein <i>et al.</i> , 1980)	Минисателлиты (Jeffreys <i>et al.</i> , 1985)
Методы, основанные на ПЦР	SSR (simple sequences repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты) (Tautz, Renz, 1984) STS (sequences tagged site) – последовательности, характеризующие locus (Olson <i>et al.</i> , 1989) SCAR (sequence characterized amplified region) – последовательность, характеризующая амплифицированную область (Paran, Michelmore, 1993) SSCP (single strand conformation polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК (Orita <i>et al.</i> , 1989) CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности (Konieczny, Ausubel, 1993)	RAPD (random amplified polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК (Welsh <i>et al.</i> , 1990; Williams <i>et al.</i> , 1990) ISSR (inter simple sequence repeats) – межмикросателлитные последовательности (Zietkiewicz <i>et al.</i> , 1994) IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами (Kalendar, Schulman, 2006) AFLP (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (Vos <i>et al.</i> , 1995) SSAP (sequence-specific amplification polymorphism) – полиморфизм специфично амплифицированных последовательностей (Waugh <i>et al.</i> , 1997)
Методы, основанные на применении ДНК-чипов	SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм (Wang <i>et al.</i> , 1998)	DArT (diversity array technology) – ДНК-чип технология для изучения разнообразия (Jaccoud <i>et al.</i> , 2001)
Тип наследования и область применения		
Наследование	Кодоминантный тип	Доминантный тип
Область применения у растений	<ul style="list-style-type: none"> • Картирование генов, хромосом и геномов • Маркирование генов • Выделение нуклеотидных последовательностей генов • Селекция с помощью молекулярных маркеров • Молекулярная паспортизация сортов • Диагностика заболеваний • Исследование генетического разнообразия • Филогенетические исследования 	<ul style="list-style-type: none"> • Филогенетические исследования • Картирование генов геномов (только AFLP, DArT) • Молекулярная паспортизация сортов • Исследование генетического разнообразия

щью молекулярных маркеров» (marker-assisted selection – MAS) и «молекулярная паспортизация сортов». Селекция с помощью молекулярных маркеров облегчает и ускоряет направленную передачу сорту-реципиенту фрагментов генома донора, содержащих целевые гены, существенно ускоряя процесс получения новых сортов, а также позволяет применять новый подход в селекции – пирамидизацию генов (Landjeva *et al.*, 2007). Молекулярная паспортизация сортов служит для повышения эффективности регистрации новых сортов, защиты авторских прав и проверки чистоты сортового материала.

Подходы к выделению нуклеотидных последовательностей генов и анализ их транскрипционной активности

Существует достаточно широкий спектр подходов для направленного выделения нуклеотидной последовательности целевого гена. Выбор подхода зависит от исходных данных о гене и от того, насколько полная информация о последовательности гена необходима для решения дальнейших задач. В табл. 2 приведены критерии выбора адекватного подхода к выделению нуклеотидной последовательности целевого гена, названия соответствующих подходов и примеры их использования. В качестве иллюстрации приведены схемы таких методов выделения нуклеотидных последовательностей генов, как дифференциальный скрининг библиотек кДНК (рис. 2), дифференциальный дисплей (рис. 3) и вычитающая гибридизация (рис. 4).

Большинство из перечисленных в табл. 2 подходов приводит к выделению частичной нуклеотидной последовательности целевого гена. Секвенирование частичной нуклеотидной последовательности достаточно для дальнейшего картирования и изучения экспрессии целевого гена. Для получения полной последовательности кДНК были разработаны методы амплификации концов кДНК *in vitro*, известные под общим названием «быстрая амплификация концевых фрагментов кДНК» (rapid amplification of cDNA ends, RACE). Эти подходы разделяются на 5'RACE и 3'RACE; принцип данных подходов основан на селективной супрессии полимеразной цепной реакции (Лукьянов и др., 1999). Дальнейшее конструирование

праймеров к различным участкам выделенной полной последовательности кДНК (или к EST) и использование их для амплификации геномной ДНК позволяют выделить последовательности интронов.

Для понимания функциональной организации и эволюции целевого гена требуется выделение его полноразмерной геномной последовательности включая промоторную область, а иногда и более протяженные прилегающие районы. Наличие полных геномных последовательностей в базах данных, полученных в результате реализации проектов по секвенированию геномов растений (например арабидопсиса или риса), позволяет на основе гомологии идентифицировать и анализировать полноразмерные последовательности целевых генов, но только у этих видов. Для того чтобы выделить полноразмерную последовательность целевого гена из неотсеквенированного генома, необходимо с помощью гомологичных последовательностей (путем гибридизации) или подобранных к ним праймеров (методом ПЦР) проводить скрининг геномных библиотек изучаемого вида. Дальнейший анализ отобранных позитивных клонов позволяет определить полноразмерную геномную последовательность целевого гена включая прилегающие районы. Выделение промоторных участков генов может проводиться и с помощью подхода, основанного так же, как и RACE-метод, на селективной супрессии полимеразной цепной реакции и известного под названиями «прогулка по хромосоме» (chromosome walking) или «прогулка по геному» (genome walking). Таким способом, например, были выделены последовательности промоторных областей гомеологичных генов *WLHS-1* пшеницы, контролирующих идентичность органов цветка (Shitsukawa *et al.*, 2007).

Реализация масштабных программ по секвенированию геномов различных организмов привела к накоплению огромного числа нуклеотидных последовательностей и поставила перед исследователями задачу определения функционального значения полученной генетической информации. Основным инструментом, определяющим функцию генов, является дифференциальное исследование генной экспрессии. Путем определения того, какие гены экспрессируются, а какие неактивны в данной

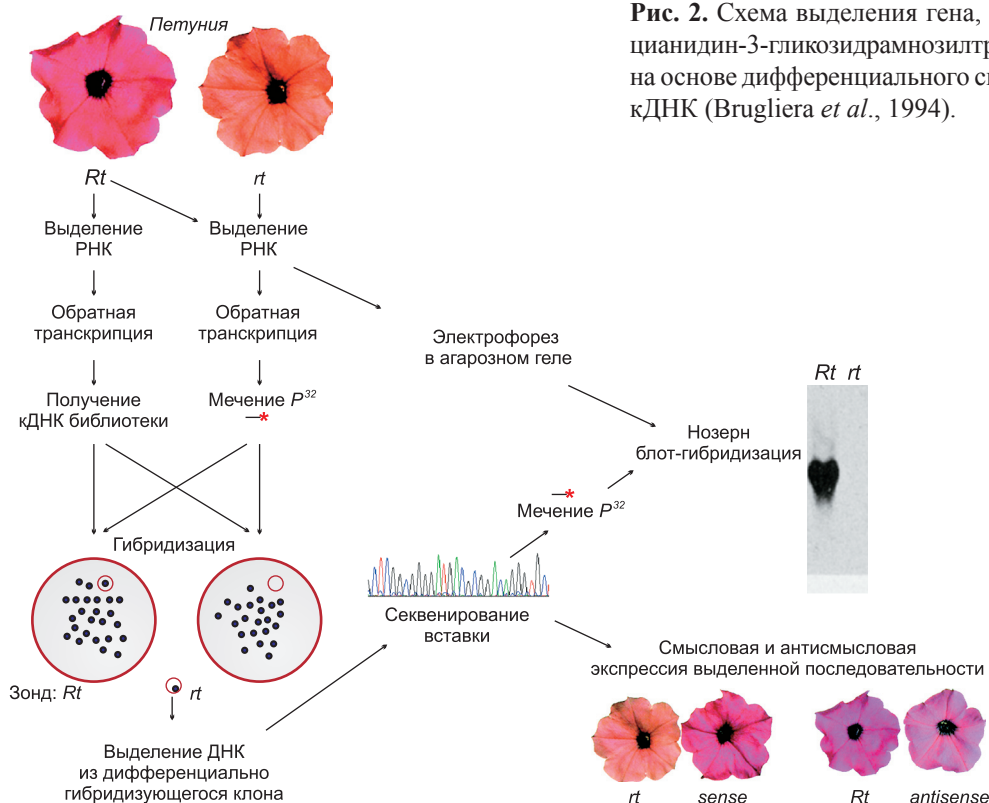


Рис. 2. Схема выделения гена, кодирующего антоцианидин-3-гликозилтрансферазу петунии, на основе дифференциального скрининга библиотек кДНК (Brugliera *et al.*, 1994).

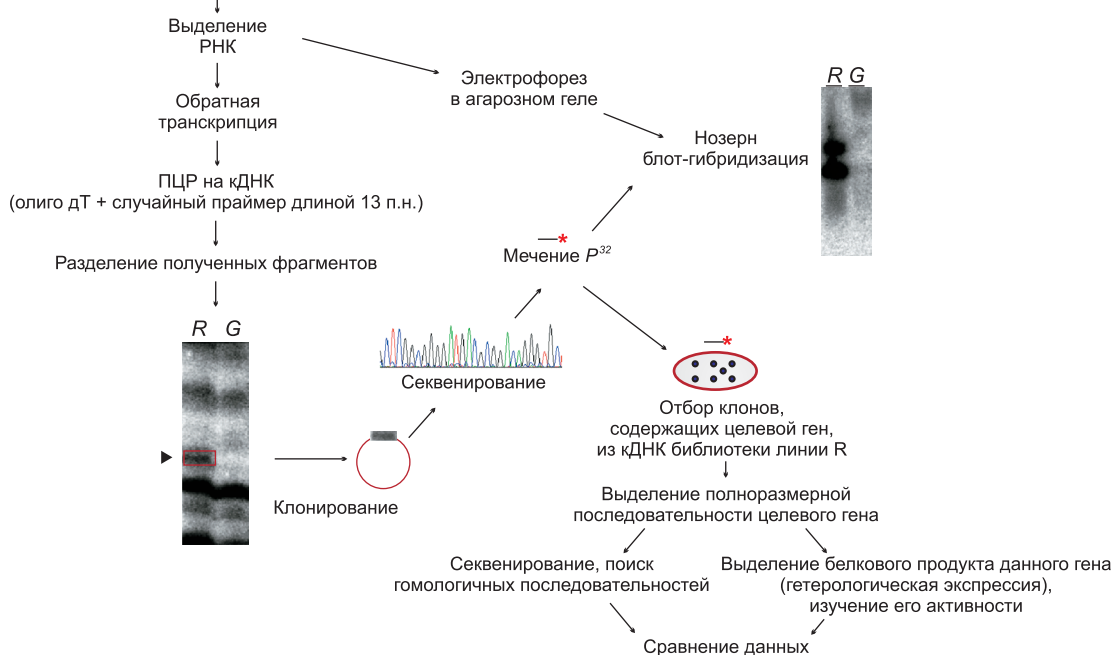


Рис. 3. Схема метода «Дифференциальный дисплей» на примере выделения гена периллы, кодирующего 5-О-гликозилантоцианидинтрансферазу (Yamazaki *et al.*, 1999).

Львиный зев

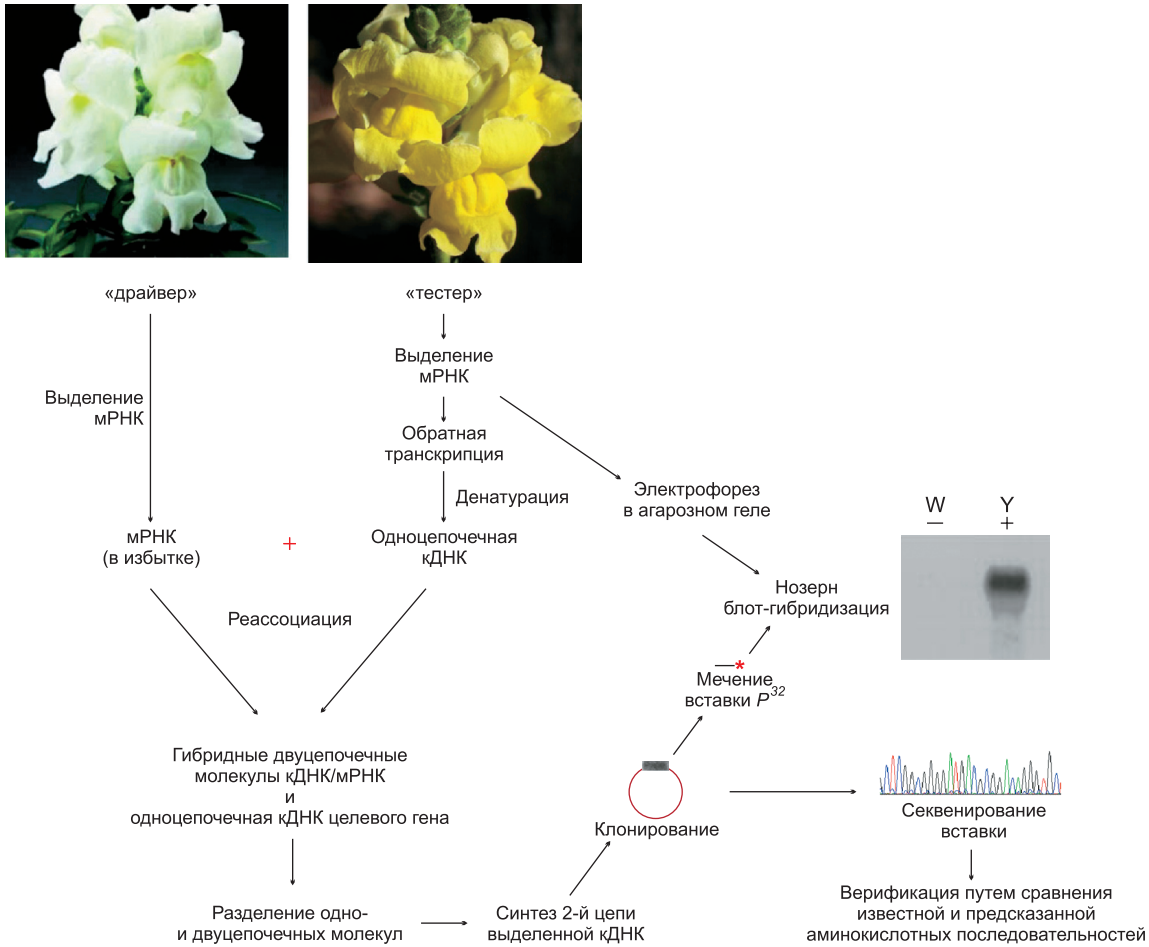


Рис. 4. Схема выделения гена, кодирующего аурузидинсинтазу львиного зева, на основе вычитающей гибридизации (Nakayama *et al.*, 2000).

ткани (органе) в данных условиях у данного организма (генотипа), можно выяснить их функциональное значение.

Методы анализа транскрипционной активности генов можно разделить на три основные группы: методы, основанные (1) на гибридизации нуклеиновых кислот, (2) на ПЦР (при использовании в качестве матрицы кДНК) и (3) на секвенировании экспрессирующихся последовательностей ДНК. Кроме того, в зависимости от поставленных задач все подходы по анализу экспрессии генов разделяются на подходы, направленные на изучение экспрессии индивидуальных генов и на выделение наиболее полного спектра генов, по экспрессии которых отличаются сравниваемые образцы (табл. 3).

К числу методов анализа транскрипционной активности генов на основе гибридизации нук-

леиновых кислот относится метод вычитающей гибридизации, позволяющий идентифицировать дифференциально экспрессирующиеся гены (рис. 4), метод Нозерн-блот гибридизации (Нозерн-блоттинг), обратный Нозерн-блоттинг, ставший прототипом современного подхода, известного как «gene expression profiling» (составление профилей экспрессии генов), основанного на различных высокопроизводительных методиках, в частности на использовании ДНК-чипов, позволяющих одновременно анализировать экспрессию тысяч генов.

Применение ДНК-чипов пришло в транскриптомику из геномики, где использование ДНК-чипов сначала было предложено в качестве альтернативного метода для секвенирования ДНК (Drmanac *et al.*, 1989), а затем и для высокопроизводительного генотипирования. Однако

Таблица 2

Критерии выбора адекватного подхода к выделению нуклеотидной последовательности целевого гена (Winkel-Shirley, 2001; Himi, Noda, 2004; Khlestkina et al., 2008)

Исходные данные 1	Исходные данные 2	Подход к выделению нуклеотидной последовательности гена	Пример
Продукт целевого гена неизвестен, с какими генами взаимодействует – не известно	Имеются мутантные или изогенные линии по целевому признаку	Метод транспозонного мечения	Ген <i>Cl</i> кукурузы, кодирующий транскрипционный фактор, необходимый для биосинтеза антоцианов (Cope et al., 1986)
	Локус картирован	Метод Т-ДНК мечения	Ген <i>LCR</i> арабидопсиса, кодирующий лейкоантоцианидинредуктазу (Devic et al., 1999)
		Дифференциальный дисплей	Ген <i>5GT</i> периллы, кодирующий 5-О-гликозидантоцианидин-трансферазу (Yamazaki et al., 1999)
		Позиционное клонирование гена	Ген <i>TTG1</i> арабидопсиса, кодирующий транскрипционный фактор, необходимый для биосинтеза антоцианов (Walker et al., 1999)
Продукт целевого гена неизвестен, но известно, с какими генами он взаимодействует	–	Саузерн-Вестерн скрининг экспрессирующейся библиотеки	Гены <i>CPRF1</i> и <i>CPRF2</i> петрушки, кодирующие регуляторные факторы биосинтеза флавоноидов (Weisshaar et al., 1991)
	Известен продукт целевого гена	Метод двугибридного скрининга	Гены <i>CPRF5</i> , <i>CPRF6</i> и <i>CPRF7</i> петрушки, кодирующие регуляторные факторы биосинтеза флавоноидов (Rügner et al., 2001)
Известна аминокислотная последовательность белкового продукта		ПЦР-скрининг кДНК библиотеки с помощью вырожденных праймеров, подобранных к аминокислотной последовательности	Ген <i>IOMT</i> люцерны, кодирующий изофлаван-О-метилтрансферазу (He et al., 1998)
Выделен белковый продукт		Метод выделения индуцированных кДНК, соответствующих аминокислотной последовательности очищенного фермента	Метод выделения индуцированных кДНК, соответствующих аминокислотной последовательности очищенного фермента
	Отсутствуют гомологичные EST в базе данных изучаемого вида	Вычитающая гибридизация + секвенирование пептидов	Ген <i>AUS</i> львиного зева, кодирующий ауреузиндинсинтазу (Nakayama et al., 2000)
Имеются гомологичные EST в базе данных изучаемого вида		Скрининг экспрессирующихся <i>in vitro</i> библиотек кДНК при помощи антител к очищенному белковому продукту	Ген <i>CHI</i> фасоли, кодирующий халконфлавонононизомеразу (Mehdy, Lamb, 1987)
	Известна нуклеотидная последовательность гена с такой же функцией у других видов	Дифференциальный скрининг библиотек кДНК	Ген <i>RT</i> петунии, кодирующий антоцианидин-3-гликозидрамнозилтрансферазу (Brugliera et al., 1994)
Отсутствуют гомологичные EST в базе данных изучаемого вида		Саузерн- или ПЦР-скрининг геномной ДНК или кДНК библиотек	Ген <i>F3H</i> кукурузы, кодирующий флаванон-3-гидроксилазу (Deboo et al., 1995)
Имеются гомологичные EST в базе данных изучаемого вида		ПЦР на геномной ДНК или кДНК с консервативными праймерами	Ген <i>DFR</i> пшеницы, кодирующий дигидрофлавонол-4-редуктазу (Himi, Noda, 2004)
	ПЦР на геномной ДНК или кДНК со специфическими праймерами	Ген <i>F3H</i> пшеницы, кодирующий флаванон-3-гидроксилазу (Khlestkina et al., 2008)	

Таблица 3

Классификация методов анализа транскрипционной активности генов

Классификация	Выделение наиболее полного спектра генов, по экспрессии которых отличаются сравниваемые образцы	Изучение экспрессии индивидуальных генов
Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот	Вычитаящая гибридизация (Sargent, Dawid, 1983) Обратный нозерн-блоттинг Гибридизация НК на микрочипах (Drmanac <i>et al.</i> , 1989)	Нозерн-блоттинг (Alwine <i>et al.</i> , 1977)
Методы, основанные на ПЦР	РНК-фингерпринтинг с помощью ПЦР (Moody <i>et al.</i> , 2001)	ОТ-ПЦР со специфическими праймерами (Rappolee <i>et al.</i> , 1988) ОТ-ПЦР в реальном времени (Higuchi <i>et al.</i> , 1993)
Методы, основанные на секвенировании экспрессирующихся последовательностей ДНК	Анализ EST (Adams <i>et al.</i> , 1991) SAGE (Velculescu <i>et al.</i> , 1997) Секвенирование транскриптома методами высокопроизводительного секвенирования (Blencowe <i>et al.</i> , 2009)	Анализ EST, гомологичных целевому гену

наиболее успешным направлением исследований с использованием ДНК-чипов стал именно анализ экспрессии генов. В основе создания ДНК-чипов для мониторинга экспрессии генов лежит возможность идентифицировать целевую последовательность на основании последовательности гибридизующейся с ней пробы. При этом пробы иммобилизованы на плоскости, и каждой из них соответствует определенная локализация (Schena *et al.*, 1995).

Первый чип для анализа экспрессии (cDNA microarray) содержал всего 45 различных последовательностей длиной около 1000 п.н., полученных с помощью ПЦР, каждая из которых соответствовала определенному гену. Для размещения проб на чипе использовалось специально сконструированное автоматическое устройство. Однако первые чипы для анализа экспрессии генов отличались рядом недостатков (дорогостоящий и трудоемкий процесс создания чипов, низкая воспроизводимость результатов, ограниченное число проб на одном чипе). Преодолеть эти недостатки удалось с применением фотолитографического метода синтеза чипов, несущих пробы в виде коротких (20–25 п.н.) олигонуклеотидов (по 10–20 олигонуклеотидов, соответствующих каждому гену). Такой подход, предложенный компанией Affymetrix (www.affymetrix.com), существенно повышает точность и воспроизводимость количественного

анализа экспрессии генов, делает возможной высокую плотность размещения проб, это позволяет анализировать с помощью одного чипа тысячи генов и полностью охватывать геном изучаемого организма.

Несколько опережая развитие методов дифференциального анализа экспрессии генов с помощью ДНК-чипов, появились и получили широкое применение методы РНК-фингерпринтинга на основе ПЦР: RAP-PCR, дифференциальный дисплей (DD-PCR), cDNA-AFLP, ACP-PCR GeneFishing. Несмотря на то что в настоящее время данные подходы уступают по своей воспроизводимости, возможности автоматизации анализа, производительности и возможности количественного анализа методам, основанным на использовании ДНК-чипов, доступность и низкая стоимость методов РНК-фингерпринтинга на основе ПЦР способствуют их широкому применению. Данные подходы основаны на ОТ-ПЦР (ПЦР на кДНК) с применением различных методов фингерпринтинга. Например, сочетание ОТ-ПЦР и AFLP дало метод cDNA-AFLP, сочетание ОТ-ПЦР и RAPD дало RAP-PCR. Метод дифференциального дисплея основан на использовании праймеров в виде олигодТ с двумя случайными основаниями на 3'-конце (рис. 3). Метод выявления дифференциально экспрессирующихся генов с помощью высокоспецифичной ПЦР (ACP-

PCR GeneFishing) основан на использовании структуры их трех составляющих, а именно из полидI (дезоксидинозин) линкера, соединяющего целевую (с 3'-конца линкера) и универсальную нецелевую (с 5'-конца линкера) последовательности. Такая конструкция позволяет значительно повысить специфичность ПЦР, а сочетание использования данной структуры и случайных праймеров дает эффективный метод выявления дифференциально экспрессирующихся генов (Moody, 2001).

Тогда как РНК-фингерпринтинг используется для выявления дифференциально экспрессирующихся генов, методы, основанные на ОТ-ПЦР со специфичными праймерами, призваны помочь исследователям выявить различия в экспрессии определенного гена у разных образцов. При этом с помощью ОТ-ПЦР могут быть продемонстрированы как качественные отличия (активен ген или неактивен), так и количественные изменения. Количественная ПЦР (или ПЦР в реальном времени) основана на флуоресцентной регистрации накопления ДНК непосредственно в процессе ПЦР, что дает возможность определять количество исходного числа матриц. В случае ОТ-ПЦР количественный анализ позволяет установить число молекул мРНК (или относительный уровень экспрессии) определенного гена в том или ином образце (Ребриков и др., 2009).

В начале 1990-х гг. развитие высокопроизводительных методов секвенирования ДНК положило начало созданию баз данных EST (expressed sequences tags) на основе секвенирования библиотек кДНК. EST получают в результате случайного отбора клонов из библиотек кДНК и секвенирования коротких участков (длиной 300–500 п.н.) из расчета один участок на клон. Количественные различия в экспрессии какого-либо гена могут быть установлены в результате подсчета частоты, с которой последовательность данного гена встречается в библиотеках, полученных на различных образцах. Результаты такого сравнения являются достаточно точными (при условии использования ненормированных библиотек, т. е. библиотек, при получении которых не происходило выравнивания численности клонов, содержащих транскрипты разных генов), а эффективность такого подхода возрастает с накоплением ин-

формации в базах данных EST.

Существует ускоренная версия секвенирования EST – последовательный анализ экспрессии генов (serial analysis of gene expression, SAGE). SAGE-последовательности получают на основе мРНК, выделяя короткую последовательность из определенного участка (как правило, SAGE-последовательности представляют собой 9 пар оснований сразу после последнего сайта узнавания эндонуклеазой в данном транскрипте). Множество SAGE-последовательностей лигируют между собой так, чтобы получались удобные для секвенирования последовательности длиной 300–500 п.н., встраивают в вектор для клонирования, секвенируют и анализируют полученные последовательности (Moody *et al.*, 2001).

С разработкой подходов высокопроизводительного секвенирования, основанных на методе пиросеквенирования (Nyren, 2007), в частности «454 секвенирования» (Rothberg, Leamon, 2008), стало возможным осуществление прямого секвенирования транскриптома. В настоящее время это наиболее точный и перспективный метод идентификации дифференциально экспрессирующихся генов (Blencowe *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

Применение современных молекулярных методов позволило существенно расширить фундаментальные исследования в области физиологической генетики, популяционной генетики, онтогенетики и филогенетики растений, получить новые данные об эволюции генома и составить представление о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе наследования и формирования полезных признаков у растений. Внедрение молекулярных методов в селекционно-генетические исследования принесло и ощутимый практический вклад и позволило эффективно проводить получение новых сортов с заранее заданными свойствами.

Литература

- Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Богданова Е.А., Лукьянов С.А. Селективная супрессия полимеразной цепной реакции // Биоорг. химия. 1999. Т. 25. С. 163–170.
- Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР в реальном времени. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 215 с.

- Хлесткина Е.К., Салина Е.А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы // Генетика. 2006. Т. 42. С. 725–736.
- Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D. *et al.* Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project // Science. 1991. V. 252. P. 1651–1656.
- Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5350–5354.
- Blencowe B.J., Ahmad S., Lee L.J. Current-generation high-throughput sequencing: deepening insights into mammalian transcriptomes // Genes Dev. 2009. V. 23. P. 1379–1386.
- Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. P. 314–331.
- Brugliera F., Holton T.A., Stevenson T.W. *et al.* Isolation and characterization of a cDNA clone corresponding to the *Rt* locus of *Petunia hybrida* // Plant J. 1994. V. 5. P. 81–92.
- Cone K.C., Burr F.A., Burr B. Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *C1* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 9631–9635.
- Devic M., Guillemot J., Debeaujon I. *et al.* The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development // Plant J. 1999. V. 19. P. 387–398.
- Deboo G.B., Albertsen M.C., Taylor L.P. Flavanone 3-hydroxylase transcripts and flavonol accumulation are temporally coordinate in maize anthers // Plant J. 1995. V. 7. P. 703–713.
- Drmanac R., Labat I., Brukner I., Crkvenjakov R. Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method // Genomics. 1989. V. 4. P. 114–128.
- He X.Z., Reddy J.T., Dixon R.A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-O-methyltransferase // Plant Mol. Biol. 1998. V. 36. P. 43–54.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993. V. 11. P. 1026–1030.
- Himi E., Noda K. Isolation and location of three homologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their tissue-dependent expression // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. P. 365–375.
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. P. e25.
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA // Nature. 1985. V. 314. P. 67–73.
- Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 2478–2484.
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Salina E.A. Relationship between homoeologous regulatory and structural genes in allopolyploid genome – a case study in bread wheat // BMC Plant Biol. 2008. V. 8. P. 88.
- Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers // Plant J. 1993. V. 4. P. 403–410.
- Landjeva S., Korzun V., Börner A. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding // Euphytica. 2007. V. 156. P. 271–296.
- Mehdy M.C., Lamb C.J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection // EMBO J. 1987. V. 6. P. 1527–1533.
- Moody D.E. Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression // J. Anim. Sci. 2001. V. 79. P. 128–135.
- Nakayama T., Yonekura-Sakakibara K., Sato T. *et al.* Aureusidin Synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration // Science. 2000. V. 290. P. 1163–1166.
- Nyren P. The history of pyrosequencing // Meth. Mol. Biol. 2007. V. 373. P. 1–13.
- Olson M., Hood L., Cantor C., Dotstein D. A common language for physical mapping of the human genome // Science. 1989. V. 245. P. 1434–1435.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H. *et al.* Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 2766–2770.
- Paran I., Michelmore R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 85. P. 985–993.
- Rappolee D.A., Mark D., Banda M.J., Werb Z. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping // Science. 1988. V. 241. P. 708–712.
- Rothberg J.M., Leamon J.H. The development and impact of 454 sequencing // Nature Biotech. 2008. V. 26. P. 1117–1124.
- Rügner A., Frohnmeyer H., Näke C. *et al.* Isolation and characterization of four novel parsley proteins that interact with the transcriptional regulators CPRF1 and CPRF2 // Mol. Genet. Genomics. 2001. V. 265. P. 964–976.

- Sargent T.D., Dawid I.B. Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis* // Science (Wash. DC). 1983. V. 222. P. 135–139.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // Science. 1995. V. 270. P. 467–470.
- Shitsukawa N., Tahira C., Kassai K. *et al.* Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS box gene in hexaploid wheat // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 1723–1737.
- Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. P. 4127–4138.
- Velculescu V.E., Zhang L., Zhou W. *et al.* Characterization of the yeast transcriptome // Cell. 1997. V. 88. P. 243–251.
- Vos P., Hogers R., Reijans M. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4407–4414.
- Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C. *et al.* The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein // Plant Cell. 1999. V. 11. P. 1337–1350.
- Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J. *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome // Science. 1998. V. 280. P. 1077–1082.
- Wang L., Li P., Brutnell T.P. Exploring plant transcriptomes using ultra high-throughput sequencing // Brief. Funct. Genom. 2010. V. 9. P. 118–128.
- Waugh R., McLean K., Flavell A.J. *et al.* Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) // Mol. Gen. Genet. 1997. V. 253. P. 687–694.
- Weisshaar B., Armstrong G.A., Block A. *et al.* Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness // EMBO J. 1991. V. 10. P. 1777–1786.
- Welle R., Schröder G., Schiltz E. *et al.* Induced plant responses to pathogen attack. Analysis and heterologous expression of the key enzyme in the biosynthesis of phytoalexins in soybean (*Glycine max* L. Merr. cv. Harosoy 63) // Eur. J. Biochem. 1991. V. 196. P. 423–430.
- Welsh J., Chada K., Dalal S.S. *et al.* Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 4965–4970.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 6531–6535.
- Yamazaki M., Gong Z., Fukuchi-Mizutani M. *et al.* Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 7405–7411.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. P. 176–183.

**MOLECULAR METHODS OF THE ANALYSIS
OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION
OF GENES AND GENOMES IN HIGHER PLANTS**

E.K. Khlestkina

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

Summary

A significant progress has been made in plant genetics in recent decades with the advent of molecular methods. Notions on the molecular mechanisms governing the inheritance and formation of valuable traits in plants have been developed. Chromosomal maps with molecular markers and genes have been compiled for the most important crops. Molecular methods have been introduced to breeding, and steps have been done to molecular certification of crop cultivars. In addition to the obvious practical advantages, molecular methods have given an impetus to basic studies in plant genetics and evolution. Modern methods of plant genetics and the range of their application are reviewed.

Key words: higher plant genomes, gene cloning, molecular markers, gene transcription.