

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КАРИОТИПИРОВАНИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© Е. С. Насонова

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: nosema@mail.ru*

Изучение кариотипов большинства грибов и протистов, хромосомы которых отличаются небольшим размером и слабой морфологической дифференциацией, вызывает трудности при использовании микроскопических методов. Анализ хромосомных наборов у таких организмов стал возможен благодаря молекулярному кариотипированию, которое базируется на фракционировании интактных хромосомных ДНК с помощью пульс-электрофореза. Для соотнесения полос, наблюдаемых в геле после электрофореза, с индивидуальными хромосомами применяют специальные методы идентификации хромосом, в том числе денситометрический анализ интенсивности свечения полос; Саузерн-гибридизацию с хромосомо- и теломероспецифичными зондами в совокупности со сравнительным кариотипированием нескольких штаммов изучаемого вида с выраженным размерным полиморфизмом гомологичных хромосом; сравнение паттернов рестрикции хромосомных ДНК с помощью двухмерного пульс-электрофореза (KARD 2-D PFGE); сравнение кариотипов у серий штаммов с межхромосомными транслокациями или другими модификациями кариотипа, приводящими к изменению размера хромосом. Помимо определения числа и размера хромосом молекулярное кариотипирование позволяет оценить уровень пloidности и размер гаплоидного генома у исследуемого организма, выявить хромосомные перестройки и связанный с ними хромосомный полиморфизм, характерный для многих одноклеточных эукариот. Анализ хромосомного набора и его пластичности актуален для изучения внутри- и межвидовой изменчивости, для исследования эволюции хромосом у близких видов и разработки моделей видообразования. Сравнение молекулярных кариотипов среди изолятов грибов и протистов имеет большое практическое значение для клинической диагностики и сельскохозяйственной микробиологии.

В обзоре обсуждены методы кариотипирования и возможности их применения для исследования хромосом грибов и протистов, описаны особенности выделения интактной высокомолекулярной ДНК хромосом и фракционирования такой ДНК с помощью электрофореза в пульсирующем электрическом поле, рассмотрены причины возникновения и способы преодоления трудностей при интерпретации электрофореграмм и описании молекулярного кариотипа, перечислены задачи, для решения которых используют молекулярное кариотипирование, с учетом современных методических требований сформулировано определение понятия «молекулярный кариотип».

Ключевые слова: молекулярный кариотип, электрофоретический кариотип, хромосомная ДНК, хромосома, хромосомный полиморфизм, одноклеточные эукариоты, протисты, грибы.

Принятые сокращения: ПЭФ — пульс-электрофорез, СК — синаптомембранный комплекс, AFLP — amplified fragment length polymorphism (полиморфизм длины амплифицированных фрагментов), ESP — смесь реагентов (EDTA, sarcosine, proteinase) для лизиса клеток и депротеинизации хромосомных ДНК, GTBM — germ tube burst method (метод получения препаратов митотических хромосом грибов при стимуляции разрыва конидиальных проростковых трубок или кончиков молодых гиф), KARD 2-D PFGE — karyotype and restriction display 2-D PFGE (двухмерный пульс-электрофорез фрагментов рестрикции хромосомных ДНК), PFGE — pulsed field gel electrophoresis (гель-электрофорез в пульсирующем электрическом поле), RFLP — restriction fragment length polymorphism (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов), YAC — yeast artificial chromosomes (искусственные хромосомы дрожжей).

Кариотипом называют совокупность фенотипических признаков, по которым можно описать и идентифицировать хромосомный набор, характерный для данной клетки, данного организма или для группы организмов того или иного таксономического ранга. Термин «кариотип» в таком его понимании был введен Г. А. Левитским (1924,

1931). Изучение кариотипов имеет большое общебиологическое значение, поскольку сведения об особенностях и изменениях хромосомного набора существенны для понимания жизненных циклов, генетических особенностей и закономерностей эволюции эукариотических организмов (White, 1973).

Основные методические подходы к анализу кариотипов

Чаще всего исследование и описание характерных особенностей хромосомных наборов — кариотипирование — проводят на митотических метафазных хромосомах, анализируя такие признаки, как число, размеры, форма и детали микроскопического строения. У высших эукариот для этого применяют методы дифференциального окрашивания (Craig, Bickmore, 1993) и новейшие технологии раскрашивания хромосом путем гибридизации *in situ* («спектральный кариотип» — Schröck et al., 1996). В некоторых случаях (например, если митотические хромосомы трудно дифференцировать друг от друга) кариологические исследования проводят на мейотических хромосомах на стадии пахитены в профазе I мейоза, когда формируются синаптонемные комплексы (СК). При этом осуществляют либо трехмерную реконструкцию серийных срезов клеток с СК («пахитенный кариотип» — Singh, 2003), либо визуализируют последние с помощью серебрения или иммуномечения на тотальных препаратах, полученных при распластывании мейотических ядер («СК-кариотип» — Moses, Counce, 1974; Богданов, Коломиец, 2007). В практику цитогенетики также вошел такой способ кариотипирования, как разделение хромосом в зависимости от содержания ДНК и ГЦ-пар с помощью проточного флуориметра — лазерного флуоресцентно-активирующего сортера («проточный кариотип» — см., например: Bartholdi, 1990). Перечисляя существующие подходы к кариотипированию, нельзя не упомянуть о виртуальном кариотипировании с использованием ДНК-микрочипов и сравнительной геномной гибридизации. В настоящее время этот метод используют главным образом в цитогенетических исследованиях человека для решения диагностических задач. На основании данных о локализации и интенсивности связывания обширного набора зондов (от сотен до нескольких миллионов) составляют и уточняют генетические карты хромосом, определяют копийность комплементарных зондам последовательностей, анализируют хромосомные наборы (Hagenkord et al., 2008). Такой подход называют также цифровым (Wang et al., 2002), или молекулярным, кариотипированием (Vermeesch et al., 2007). Использование последнего термина в этом смысле нельзя признать корректным, так как он был применен ранее совсем в другом значении и для описания совсем другого метода (Schwartz, Cantor, 1984).

Кариотипирование эукариотических микроорганизмов с помощью микроскопических и генетических методов: достижения и проблемы

Существенную часть биоразнообразия эукариот составляют протисты и грибы. Эти две обширные по количеству и многообразию видов группы объединяют преимущественно микроскопических одноклеточных или микселиальных (в случае грибов) организмов, находящихся на дотканевом уровне организации. В рамках данного обзора мы обобщенно называем эти две группы «эукариотическими микроорганизмами», прекрасно понимая, что этот термин может использоваться и в более широком смысле. К микроскопическим эукариотам можно отнести и некоторых низших Metazoa, к изучению хромосомных

наборов которых, насколько нам известно, не пытались применить молекулярное кариотипирование (по-видимому, из-за сложностей с накоплением большого числа клеток для выделения хромосомной ДНК и из-за относительно крупных размеров хромосом).

У подавляющего большинства грибов и протистов описание кариотипа методами классической цитогенетики затруднено из-за сравнительно небольшого размера хромосом и их слабой морфологической дифференциации. Приводимые в литературе сведения о подсчете хромосом у представителей разных таксонов грибов и протистов зачастую противоречивы, их достоверность неоднократно ставилась под сомнение (Райков, 1978). Исключение здесь составляют отдельные благоприятные объекты из некоторых групп грибов (Wieloch, 2006) и протистов (Grell, 1957; Cleveland, 1958; Grassé, Hollande, 1963; Robson, Williams, 1977; Седова, 1996; Zubáková et al., 2008, и др.), представители которых отличаются относительно крупными размерами клеток и небольшим числом хромосом. Особенно заметных успехов при кариотипировании таких благоприятных объектов удалось добиться в последние десятилетия с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (Taga, Murata, 1994; Succang et al., 2003).

Для изучения хромосом у представителей большинства других таксонов эукариотических микроорганизмов приходится применять различные косвенные подходы. Например, для ряда грибов и протистов, в жизненных циклах которых есть мейоз или парасексуальный процесс, число хромосом в гаплоидном наборе было оценено путем определения числа генетических групп сцепления (Papa, 1976). При анализе серийных срезов митотического веретена на стадии ранней анафазы по числу кинетохорных бляшек оценили количество хромосом у почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Peterson, Ris, 1976) и у малярийного плазмодия *Plasmodium falciparum* (Prensier, Slomianny, 1986). Полноценное описание пахитенного кариотипа было выполнено для *Labyrinthula* sp. (Moens, Perkins, 1969), некоторых грибов (Gillies, 1972; Boehm, Bushnell, 1992, и др.), миксомицетов (Lie, Laane, 1982) и плазмодиофорид (Braseltan, 1982). Метод СК-кариотипирования также был адаптирован и применен для ряда грибов (Pukkila, Lu, 1985; Мажейка, Коломиец, 2003, и др.) и кокцидии *Eimeria tenella* (Del Cacho et al., 2005).

Упомянутые выше методы пригодны, к сожалению, для изучения хромосом лишь у ограниченного круга одноклеточных эукариот. У представителей многих групп грибов и протистов в жизненном цикле отсутствует мейоз, а в ходе соматической пролиферации клетки делятся путем закрытого или полуоткрытого митоза, в ходе которого хромосомы конденсируются слабо и практически не могут быть идентифицированы на электронограммах. У многих одноклеточных эукариот кинетохоры морфологически слабо выражены и поэтому также не могут служить ориентирами для оценки числа хромосом (Райков, 1978; Райков, 1982; Скарлато, 2000). Низкое содержание ДНК в хромосомах не позволяет эффективно применять и проточную цитометрию для кариотипирования этих организмов. Прорыв в изучении их хромосом наметился 30 лет назад, когда в практику кариологии грибов и протистов вошел метод молекулярного кариотипирования, базирующийся на применении геле-электрофореза в пульсирующем электрическом поле (pulsed field gel electrophoresis, PFGE), который в русскоязычной научной литературе по-

лучил сокращенное название пульс-электрофорез (ПЭФ). В отличие от других методов описания кариотипа молекулярное кариотипирование подразумевает изучение фенотипических особенностей молекул ДНК, входящих в состав хромосом.

Молекулярное кариотипирование: круг объектов исследования и методические нюансы

С помощью метода ПЭФ можно фракционировать молекулы ДНК размером от 10 т. п. н. до 10 млн п. н. (Orbach et al., 1988). Следовательно, с его помощью нельзя разделить целые хромосомные ДНК высших эукариот, размер которых составляет несколько десятков миллионов пар нуклеотидов (например, самая маленькая хромосома человека имеет размер около 50 млн п. н. — International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). В то же время размерный диапазон хромосомных ДНК у большинства эукариотических микроорганизмов хорошо укладывается в границы разрешения этого метода.

В современной кариологии грибов и протистов этот метод стал признанным подходом к анализу хромосомного состава. Молекулярные кариотипы описаны для более чем 100 видов грибов, в основном базидио- и аскомицетов (см. обзоры: Mills, McCluskey, 1990; Skinner et al., 1991; Hornok, 1999; Beadle et al., 2003), и для представителей более чем 50 родов свободноживущих и паразитических протистов (Van der Ploeg et al., 1992; Hernandez-Rivas, Scherf, 1997). Для целого ряда объектов, например дрожжей *S. cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, микелиальных аскомицетов *Aspergillus nidulans* и *Neurospora crassa*, малярийного плазмодия *P. falciparum*, трихомонады *Trichomonas vaginalis*, было показано полное соответствие между числом гетерологичных хромосомных ДНК, идентифицируемых в геле после ПЭФ, с одной стороны, и числом хромосом, выявляемым с помощью методов микроскопии, и (или) числом генетических групп сцепления — с другой (Schwartz, Cantor, 1984; Carle, Olson, 1985; Kemp et al., 1987; Smith et al., 1987; Vollrath, Davis, 1987; Orbach et al., 1988; Brody, Carbon, 1989; Lehker, Alderete, 1999).

Анализ молекулярного кариотипа (термин, принятый в среде протистологов) (Schwartz, Cantor, 1984) или электрофоретического кариотипа (термин, который преимущественно используется в микологической литературе) (Carle, Olson, 1985) — это многоступенчатый процесс. На первом этапе необходимо накопить клетки исследуемого организма в достаточном количестве и адаптировать для них метод экстракции интактной высокомолекулярной ДНК. На втором этапе подбирают условия для фракционирования хромосомных ДНК исследуемого организма в агарозном геле с помощью электрофореза в пульсирующем электрическом поле. Третий этап подразумевает интерпретацию полученных электрофореграмм, обобщение данных о числе наблюдаемых полос и размере мигрирующих в них хромосомных ДНК и последующую идентификацию индивидуальных хромосом с привлечением дополнительных методов исследования.

Подготовка материала. Технология выделения интактных ДНК индивидуальных хромосом включает в себя обязательный этап заключения большого числа (10^8 — 10^9) живых клеток исследуемого организма в легкоплавкую агарозу (в случае крупных объектов может

быть достаточно 10^6 клеток — Willhoeft, Tannich, 1999). Агароза предохраняет высокомолекулярные ДНК от разрушительного воздействия сдвиговых сил. Используют агарозу высокой степени очистки, протестированную на отсутствие загрязнений нуклеазами. Существуют и специально разработанные марки агарозы для приготовления блоков для пульс-электрофореза, например Agarose for pulsed field electrophoresis sample preparation (Sigma-Aldrich Inc., США) и Sea Plaque® GTG® agarose (Bio-Whittaker Inc., США). Полученные агарозные блоки (в англоязычной литературе — DNA inserts, PFGE plugs) инкубируют при 50 °C в течение 48 ч в смеси ESP (EDTA, Sarcosine, Proteinase), содержащей 0.5 М EDTA (pH 9.4), 1%-ный N-лаурилсаркозин и 1 мг/мл протеиназы К. В этой смеси происходят лизис клеток и депротенинизация ДНК в присутствии EDTA, металл-хелатирующего агента, ингибирующего активность нуклеаз. Протеиназа К эффективно удаляет белковые примеси, быстро ингибирует нуклеазы и при этом устойчива к денатурирующим и хелатирующим агентам. При проведении экстракции хромосомной ДНК к буферному раствору, содержащему протеиназу К и EDTA, обычно не требуется добавлять другие ингибиторы нуклеаз.

В случае экстракции хромосомной ДНК из клеток, окруженных клеточной стенкой или другими дополнительными оболочками, перед инкубацией в смеси ESP проводят предварительную обработку. Обычно подбирают ферменты, которые разрушают клеточные покровы и не требуют для своей работы присутствия двухвалентных катионов, что позволяет проводить ферментативную обработку в присутствии большого количества EDTA для предотвращения деградации хромосомной ДНК. Например, агарозные блоки с заключенными клетками дрожжей перед экстракцией хромосомной ДНК инкубируют в растворах, содержащих зимолиазу, бета-глюкуронидазу или новозим (Maule, 1994).

При кариотипировании паразитов, которых не удается поддерживать *in vitro* в аксеничной культуре, на предварительном этапе отделяют внутриклеточные формы паразита от материала хозяина или накапливают клетки паразита на расселительной стадии развития (Van der Ploeg et al., 1984; Corcoran et al., 1986; Pinevitch et al., 1997; Соколова и др., 1998; Graf et al., 2001). Клетки паразита, предназначенные для переживания и расселения в окружающей среде, обычно покрыты плотными оболочками, поэтому перед исследователями встает задача подобрать реагенты для деградации последних или имитировать *in vitro* условия, при которых *in vivo* происходит освобождение клеток от оболочек. Например, споры микроспоридий подвергают разным вариантам предварительной обработки, которая приводит либо к стимуляции экстрезии полярных трубок и высвобождению спороплазм, либо к частичной деградации оболочки (Malone, McIvor, 1993; Biderre et al., 1994). Ооцисты кокцидий и цисты лямблий перед заключением в агарозу инкубируют в растворах, стимулирующих их эксцистирование (Campbell et al., 1990; Shirley et al., 1990; Sibley, Boothroyd, 1992).

Очистка клеток паразитов от материала хозяина весьма желательна, так как снижает вероятность появления технических сложностей, возникающих из-за присутствия контаминирующих нуклеаз и фоновой деградированной ДНК. Однако получение чистых препаратов клеток паразита не всегда возможно и, строго говоря, зачастую не является обязательным, поскольку высокомолекуляр-

ная недеградированная ДНК хозяина обычно не входит в гель при параметрах, используемых для фракционирования хромосомных ДНК эукариотических микроорганизмов (Соколова и др., 1998).

Тонкостям таких процедур, как заключение клеток в агарозные блоки, их последующий лизис и депротенинизация, неоднократно уделялось внимание в специальных методических обзорах, посвященных ПЭФ и молекулярному кариотипированию (Van der Ploeg et al., 1992; Maule, 1994; Hernandez-Rivas, Scherf, 1997; Maringele, Lydall, 2006), поэтому мы не будем здесь более подробно рассматривать эти вопросы.

Фракционирование ДНК. После депротенинизации в агарозных блоках высокомолекулярные ДНК фракционируют с помощью ПЭФ. Теоретические и практические аспекты этого метода также неоднократно обсуждались в литературе (Chu, 1990; Burmeister, Ulanovsky, 1992; Maule, 1998; Насонова, 2008), и мы не будем здесь на них специально останавливаться. Отметим лишь следующие принципиальные моменты. Оптимального разделения всех хромосомных ДНК исследуемого организма редко удается достигнуть в ходе одного раунда ПЭФ. Если хромосомные ДНК значительно различаются по размеру, используют несколько программ (или несколько блоков в рамках одной программы), адаптированных для хромосомных ДНК разных размерных классов. Такой подход применяли при изучении молекулярного кариотипа кинетопластид (Bastien et al., 1992; Cano et al., 1995; Wincker et al., 1997; Melville et al., 1998, 2000), споровиков (Kemp et al., 1987; Shirley et al., 1990), многих базидио- и аскомицетов (Fraissinet-Tachet et al., 1996; Zhong et al., 2002). Часто исследователи сталкиваются с обратной ситуацией: хромосомные ДНК исследуемого организма незначительно различаются по размеру. В таких случаях на электрофореграммах наблюдают большое число близко расположенных полос, как например при разделении хромосомных ДНК микроспоридий (Biderre et al., 1997; Nasonova et al., 2005) и аскомицета *Pneumocystis carinii* (Cornillot et al., 2002). В таких случаях тоже можно рекомендовать использовать серию программ, каждая из которых адаптирована для фракционирования молекул в очень узком диапазоне размеров. Например, при использовании трех программ, в ходе каждой из которых время импульса возрастало ступенчато на небольшую величину (20–30 с), удалось фракционировать многочисленные хромосомные ДНК в размерном диапазоне 135–485 т. п. н. (18 мажорных и 13 минорных полос), образующие молекулярный кариотип микроспоридии *Paranosema grylli* (Nasonova et al., 2005).

Размерные маркеры. *S. cerevisiae* и *S. pombe* — первые организмы, у которых были описаны молекулярные кариотипы (Schwartz, Cantor, 1984; Carle, Olson, 1985; Smith et al., 1987). Размер их хромосомных ДНК был рассчитан на основании результатов рестрикционного анализа (Fan et al., 1989, 1991; Link, Olson, 1991). Благодаря этим исследованиям мы имеем весьма точные оценки размеров хромосом у этих организмов, поэтому препараты с их хромосомными ДНК используют в качестве размерных стандартов. Целый ряд фирм предлагают маркеры для ПЭФ с хромосомными ДНК почкующихся дрожжей: *S. cerevisiae* YNN 295 (Sigma — Aldrich Inc., США; GE Healthcare UK Ltd., Великобритания; Bio-Rad Laboratories, США), *S. cerevisiae* YPH 80 (New England Biolabs Inc., США) и *S. cerevisiae* YPH 755 (Roche Diagno-

stics GmbH, Германия), которые используют в размерном диапазоне от 200 т. п. н. до около 2.2 млн п. н. Всего в кариотипе *S. cerevisiae* 16 хромосом, из которых 15 входят в гель и хорошо фракционируются при ПЭФ, поэтому их размер был оценен довольно точно. Размер самой большой хромосомы превышает 2.2 млн п. н. и сильно варьирует у разных штаммов. При проведении ПЭФ высокомолекулярная ДНК этой хромосомы зачастую остается в кармане геля, ее размер не был оценен с помощью рестрикционного анализа.

Препараты с хромосомными ДНК делящихся дрожжей *S. pombe* используют в диапазоне свыше 3 млн п. н. Например, в молекулярном кариотипе штамма 972h описаны хромосомные ДНК размером 3.5, 4.6 и 5.7 т. п. н. (Smith et al., 1987). Препараты с высокомолекулярными ДНК хромосом этого штамма производит, например, фирма Bio-Rad Laboratories (США).

Диапазон от около 1.0 до 3.1 млн п. н. «перекрывают» гетероталлические дрожжи *Hansenula wingei*, размер семи хромосом которых был также оценен достаточно точно (Jones et al., 1989). Коммерческие препараты с хромосомными ДНК *H. wingei* YB-4662-VIA доступны от Bio-Rad Laboratories (США).

Особенности пульс-электрофореграмм. Зачастую полосы, наблюдаемые в геле после ПЭФ, отличаются нестехиометрической интенсивностью окрашивания ДНК-специфичными флуорохромами. Это может быть связано с целым рядом причин, например с недостаточным разделением гетерологичных молекул хромосомных ДНК близкого размера (Wincker et al., 1996; Melville et al., 1998), с размерным полиморфизмом гомологов (Mills, McCluskey, 1990; Zolan, 1995), с присутствием увеличенного числа копий отдельных хромосом — анеуплоидией природных изолятов (Hansen et al., 1986), присутствием варибельного числа сверхчисленных В-хромосом (Covert, 1998), комиграцией хромосомных и экстрахромосомных молекул ДНК, например митохондриальных, пластидных и плазмидных ДНК (Dunn et al., 1998; Riveron et al., 2000; Pantou, Typas, 2005; Zuccaro et al., 2009). Необходимо также учитывать, что на одной дорожке геля мы анализируем хромосомные ДНК, выделенные из 10^8 – 10^9 клеток. Интерпретация такого «кумулятивного кариотипа» может быть затруднена из-за внутрипопуляционного полиморфизма, с которым сталкиваются при работе с природными изолятами или с лабораторными организмами, которых не удается поддерживать в клеточных культурах и для которых не разработаны методы клонирования, а также в опытах с организмами, у которых часто имеют место хромосомные перестройки (например, как в случае *Giardia lamblia*; Le Blancq et al., 1991, 1992).

В литературе, посвященной ПЭФ, хромосомные ДНК зачастую называют просто «хромосомами», имея в виду, что при использовании соответствующих щадящих методов экстракции ДНК из заключенных в легкоплавкую агарозу клеток получают препараты интактных хромосомных ДНК. Однако говорить о хромосомах уместно только после проведения идентификации. Мелвилл с соавторами (Melville et al., 1998) предложили понятие «ПЭФ полоса», или «хромосомная полоса», для описания зон, наблюдаемых в геле после ПЭФ и окрашивания ДНК-специфичным флуорохромом. Для соотнесения каждой из полос молекулярного кариотипа с одной или несколькими индивидуальными хромосомами применяют описанные ниже методы.

Идентификация индивидуальных хромосом в молекулярных кариотипах

В первых опытах по фракционированию хромосом почкующихся дрожжей *S. cerevisiae*, организма с 16 генетически определяемыми группами сцепления, наблюдали в геле 12 полос с разной интенсивностью окрашивания (Carle, Olson, 1985). С помощью Саузерн-гибридизации с зондами к генам, которые ранее были генетически картированы, авторы показали, что 3 полосы из 12 соответствуют не одной, а двум хромосомам каждая. Исследователи обнаружили, что размеры гомологичных хромосом варьируют между штаммами дрожжей, и описанные выше дубликаты могут быть успешно разделены у некоторых штаммов. ДНК самой крупной хромосомы XII в этих опытах не входила в гель или оказывалась в диффузной зоне на выходе из кармана. Таким образом, исследователи смогли идентифицировать все 16 хромосом *S. cerevisiae* (Carle, Olson, 1985).

Для ряда грибов, у которых определены генетические группы сцепления и картированы хромосомные перестройки, индивидуальные хромосомы в молекулярном кариотипе были идентифицированы с помощью Саузерн-гибридизации с зондами к группа-специфичным маркерам при использовании в работе серий штаммов с хорошо изученными межхромосомными транслокациями. В частности, использовали штаммы аскомицета *Aspergillus nidulans* с транслокациями, затрагивающими хромосому, локализация которой в молекулярном кариотипе была уже установлена с помощью гибридизации, и хромосому, еще не идентифицированную в молекулярном кариотипе (Brody, Carbon, 1989). Похожий подход использовали для идентификации хромосом в молекулярном кариотипе *S. cerevisiae* (Schwartz, Cantor, 1984) и *Neurospora crassa* (Kelkar et al., 2001).

Для фракционирования комигрирующих хромосом и их идентификации возможно также привлечение мутантных штаммов с индуцированными модификациями в кариотипе, приводящими к изменению размера хромосом. Например, Вердос с соавторами (Verdoes et al., 1994) использовали серию штаммов *Aspergillus niger* с кариотипами, в которых размер одной из комигрирующих хромосом был искусственно увеличен путем встраивания дополнительных копий гена *glaA*. С помощью индуцированной фрагментации размер хромосом может быть искусственно уменьшен. Например, в опытах с *S. cerevisiae* фрагментированные хромосомы получали с помощью трансформации клеток небольшими линейными молекулами, содержащими теломерные и центромерные последовательности, а также участки, гомологичные эндогенным геномным последовательностям (Vollrath et al., 1988).

Круг объектов, с которыми возможно проведение генетических манипуляций, довольно ограничен. В более общем случае, при работе с организмами, к которым малоприменимы описанные выше подходы, для интерпретации наблюдаемого в геле рисунка полос применяя денситометрический анализ электрофореграмм и (или) (радио)автографов, а также такие методы идентификации индивидуальных хромосом, как Саузерн-гибридизация с хромосомоспецифичными и теломерспецифичными зондами, сравнение кариотипов у серий изолятов с выраженным внутривидовым размерным полиморфизмом хромосом и анализ паттернов рестрикции хромосомных ДНК. Эти более универсальные подходы могут быть использо-

ваны для широкого круга объектов с неизвестным числом групп сцепления, для которых не получены трансформанты и штаммы с транслокациями и другими модификациями в кариотипе. Использование этих методов помогает прояснить ситуацию, однако зачастую из-за частых хромосомных перестроек, размерного полиморфизма и варьирующей ploидности отдельных хромосом надежное описание хромосомного набора у исследуемого организма представляет собой весьма непростую задачу.

Так, например, на электрофореграммах с фракционированными хромосомными ДНК *Trypanosoma cruzi* CL Brener идентифицировано 20 полос, различающихся нестехиометрической интенсивностью свечения после окрашивания бромистым этидием. Чтобы разобраться с числом индивидуальных хромосом в кариотипе этого организма, Кано с соавторами (Cano et al., 1995) использовали гибридизацию с теломероспецифичным зондом. Полученные радиоавтографы были сканированы и проведен денситометрический анализ обнаруженных пятен. Интенсивность сигнала для самой маленькой хромосомы была выбрана как стандарт минимальной ploидности. Интенсивность сигнала от всех других полос сравнивали с этим стандартом. Далее рассчитывали число хромосомных эквивалентов для каждой из 20 идентифицированных полос. Таким способом авторы получили приблизительную оценку общего числа хромосом в клетке; оно оказалось равно 64. Полученный результат дал основание предположить, что большая часть полос, наблюдаемых в геле с фракционированными хромосомными ДНК *T. cruzi* CL Brener, содержит две хромосомы или более, однако гомо- или гетерологичная природа этих хромосом и, следовательно, число индивидуальных хромосом в гаплоидном наборе у этого паразита остались невыясненными.

Используя специальные сканеры для гелей (или профессиональные цифровые камеры) и соответствующее программное обеспечение, можно также проводить денситометрическое сравнение интенсивности свечения полос с хромосомными ДНК исследуемого объекта и с маркерными ДНК непосредственно в геле. Такой подход использовали при изучении кариотипов нескольких штаммов *T. cruzi* (Branche et al., 2006). В соответствии с оценками, полученными этими авторами, в молекулярном кариотипе *T. cruzi* CL Brener идентифицировано 38 полос, которые соответствуют 55 хромосомам.

Денситометрический анализ полос в гелях и на электрофореграммах — наиболее простой и доступный, но наименее информативный способ идентификации хромосом. Он позволяет уточнить число хромосом, но не дает возможности установить их природу. Саузерн-гибридизация с использованием теломер- и хромосомоспецифичных зондов (амплифицированных последовательностей протеинкодирующих и рРНК генов, клонов из разного рода библиотек, RFLP и AFLP маркеров) представляет собой более эффективный подход для идентификации хромосом, поскольку при использовании большого числа зондов обычно удается надежно выявлять группы сцепления. Например, с помощью 244 хромосомоспецифичных зондов 36 групп сцепления, которые, по-видимому, соответствуют 36 индивидуальным хромосомам, были идентифицированы в молекулярном кариотипе *Leishmania major* Friedlin. На электрофореграммах с фракционированными хромосомными ДНК этого штамма наблюдали 28 полос разной ширины и яркости (Wincker et al., 1996). 210 зондов, 61 из которых — хромосомоспецифичные, были использованы для гибридизации с хромосомными

ДНК *T. cruzi* CL Brener. В результате набор хромосом стал понятен в 7 из 20 полос, наблюдаемых в геле с фракционированными хромосомными ДНК этого организма. В частности, обнаружили, что в одной из полос мигрировали три гетерологичные хромосомы, и наоборот, две пары полос оказались гомологичными дублетами, причем в одном из этих дублетов гомологи различались по размеру на 1.75 млн п. н. (Porcile et al., 2003).

Мелвилл с соавторами (Melville et al., 1998) считают, что для распознавания индивидуальных хромосом среди набора хромосомных ДНК, фракционированных в ПЭФ-геле, желательнее локализовать около 10 зондов на каждую потенциальную хромосому. Так, например, для идентификации 11 хромосом с генами «домашнего хозяйства» в кариотипе *T. brucei* TREU927/4 эти авторы использовали 401 кДНК-зонд, в том числе 168 хромосомоспецифичных (Melville et al., 1998).

В случае комиграции нескольких гетерологичных хромосом близкого размера и при наличии размерных вариантов гомологичных хромосом, мигрирующих в разных полосах, интерпретация результатов Саузерн-гибридизации значительно облегчается, если есть возможность сравнить данные, полученные для нескольких штаммов (изолятов) изучаемого вида с выраженным хромосомным полиморфизмом. При таком сравнительном кариотипировании обычно удается выявить штамм, у которого, например, комигрирующие у других штаммов хромосомы различаются по размеру и могут быть фракционированы, или у гомологов не выявляется размерный полиморфизм и поэтому они мигрируют в пределах одной полосы. Этот подход значительно облегчил анализ молекулярных кариотипов у многих организмов, например у *Leishmania* spp. (Wincker et al., 1997), *Entamoeba histolytica* (Willhoeft, Tannich, 1999), *T. cruzi* (Branche et al., 2006) и *Phytomonas* spp. (Marin et al., 2008). На основе сравнительного кариотипирования был разработан простой метод идентификации хромосом и установления хромосомной локализации ДНК-маркеров в кариотипах *Leishmania* spp. Старого Света. Из серии кариотипированных штаммов были выбраны три референтных, которые отличались таким высоким уровнем хромосомного полиморфизма, что наборы комигрирующих гетерологов различались в каждом из трех штаммов. Это дало возможность определять хромосомную локализацию любого нового зонда с помощью гибридизации с хромосомными ДНК референтных штаммов. Более того, хромосомы из кариотипа любого нового штамма лейшманий Старого Света могут быть идентифицированы путем гибридизации с хромосомными ДНК этих трех референтных штаммов (Wincker et al., 1997).

Для идентификации размерных вариантов гомологов удобно использовать зонды к одно- и малокопийным генам. Отбор зондов проводят с помощью Саузерн-гибридизации с рестрицированной геномной ДНК исследуемого организма, что позволяет получить сведения о копийности соответствующих последовательностей в гаплоидном геноме и отобрать одно- и малокопийные. Гибридизация фракционированных хромосомных ДНК с такими зондами облегчает идентификацию различающихся по размеру гомологов и позволяет сделать вывод о числе копий данной хромосомы в клетке (т. е. получить оценку уровня так называемой функциональной плоидности). Этот прием использовался, например, при анализе молекулярных кариотипов *E. histolytica* (Willhoeft, Tannich, 1999) и *Giardia lamblia* (Le Blancq, Adam 1998). На электрофореграммах с фракционированными хромосом-

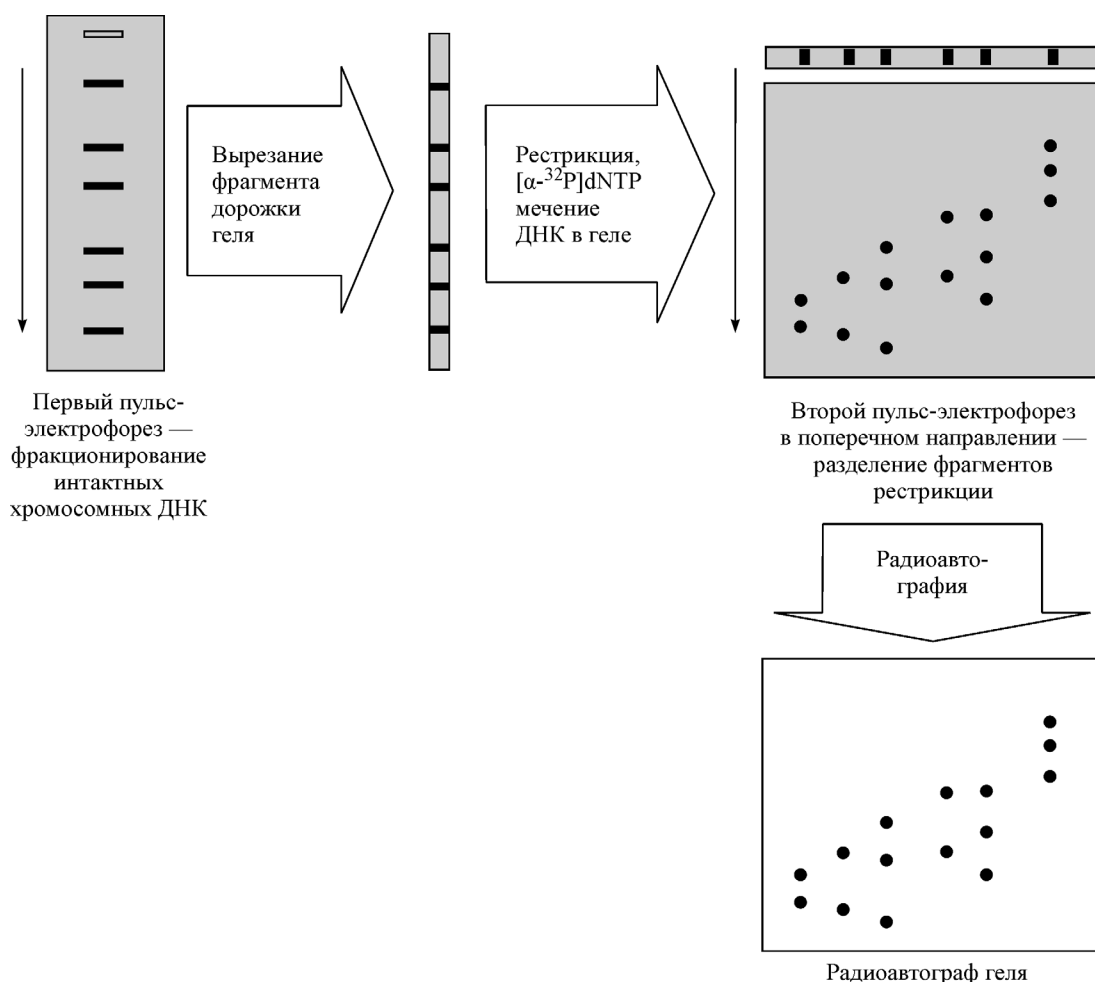
ными ДНК разных штаммов *E. histolytica* наблюдали 31—35 полос. Для гибридизации использовали 68 зондов из кДНК-библиотеки, из которых 34 соответствовали однокопийным последовательностям. Было обнаружено 14 групп сцепления, причем зонды к однокопийным последовательностям «распознавали» от 1 до 4 полос. Таким образом, было показано, что в кариотипе энтамеб может быть до четырех гомологичных хромосом, различие в размере которых достигает 1 млн п. н. (Willhoeft, Tannich, 1999).

На электрофореграммах с фракционированными хромосомными ДНК *G. lamblia* наблюдали 5 интенсивно окрашенных и варибельное число слабо окрашенных полос. С помощью Саузерн-гибридизации с использованием 12 зондов к однокопийным генам обнаружили 5 групп сцепления (гетерологичных хромосом), каждая из которых была представлена 1—4 размерными вариантами (Adam et al., 1988; Le Blancq, Adam, 1998).

Особое место в ряду ДНК-зондов для анализа молекулярных кариотипов занимают теломероспецифичные. По числу и интенсивности сигналов, наблюдаемых при Саузерн-гибридизации теломерного зонда с фракционированными хромосомными ДНК, можно уточнить число хромосом у исследуемого организма (в частности, выявить комигрирующие гетерологичные хромосомы) и дифференцировать полосы, которые соответствуют экстрахромосомным ДНК. Для более точного результата Саузерн-гибридизацию с теломероспецифичными зондами проводят не только на блотах с интактными хромосомными ДНК, но и на блотах с фрагментами рестрикции хромосомных ДНК, экстрагированных из вырезанных кусочков ПЭФ-геля, соответствующих отдельным полосам. В случае если в вырезанной полосе мигрировал только один тип хромосомной ДНК, на (радио)автографе геля будут выявлены только два сигнала; если же в вырезанном фрагменте геля комигрировали две гетерологичные хромосомы и более, то число сигналов увеличится до четырех и более соответственно. Этот подход был использован, например, при анализе молекулярных кариотипов у *Babesia bovis* (Jones et al., 1997) и *Cochliobolus sativus* (Zhong et al., 2002). В некоторых случаях оценку числа хромосом с помощью теломероспецифичных зондов осуществляют путем Саузерн-гибридизации на блотах с рестрицированной тотальной геномной ДНК исследуемого организма, полученные сведения используют для интерпретации паттерна полос и описания молекулярного кариотипа (Pantou, Typas, 2005).

Наиболее эффективный подход, который сравнительно недавно начали использовать для идентификации индивидуальных хромосом в молекулярных кариотипах эукариот, — двухмерный пульс-электрофорез, сопряженный с рестрикционным анализом хромосомных ДНК. В 2000 г. Брюжер и Корнийо с соавторами (Brugère et al., 2000a, 2000b, 2000c) предложили сравнительно быстрый способ распознавания хромосом в молекулярных кариотипах с помощью сравнения паттернов фрагментов рестрикции хромосомных ДНК. В англоязычной литературе этот метод получил название Karyotype and Restriction Display 2-D PFGE (KARD 2-D PFGE). Мы предпочли использовать английскую аббревиатуру для обозначения этого метода, поскольку перевод и сокращение лаконичного английского названия вызывают определенные трудности.

Этот метод основан на использовании двухмерного пульс-электрофореза и подходах, применяемых для физи-



Принцип двухмерного пульс-электрофореза, сопряженного с рестрикционным анализом хромосомных ДНК (KARD 2-D PFGE).

Хромосомные ДНК, фракционированные в агарозном геле в ходе первого пульс-электрофореза, обрабатывают редкощепящими рестриктазами и метят с помощью $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ в ходе ник-трансляции, после чего проводят разделение меченных рестрикционных фрагментов в ходе второго пульс-электрофореза в направлении, перпендикулярном первоначальному. Последующая визуализация разделенных фрагментов осуществляется посредством радиоавтографии. Тонкие черные стрелки показывают направление миграции ДНК в геле.

ческого картирования хромосом бактерий (Grimont, Grimont, 1991) и хромосом *Plasmodium falciparum* (Hernandez-Rivas, Scherf, 1997). Для того чтобы повысить чувствительность метода и иметь возможность анализировать сразу весь молекулярный кариотип, авторы предложили оригинальный протокол для рестрикции и радиоактивного мечения хромосомной ДНК непосредственно в геле. Тонкая (толщиной 1—2 мм) полоска с хромосомными ДНК, фракционированными в ходе первого ПЭФ, вырезается из геля. Далее иммобилизованные в геле хромосомные ДНК обрабатываются редкощепящими рестриктазами и метятся путем ник-трансляции, после чего проводится разделение меченных рестрикционных фрагментов в ходе второго ПЭФ в направлении, перпендикулярном первоначальному.

Последующая визуализация разделенных фрагментов осуществляется посредством радиоавтографии (Brugère et al., 2000b) (см. рисунок). Эта процедура позволяет получить специфический паттерн фрагментов рестрикции для каждого типа молекул хромосомной ДНК из молекулярного кариотипа организма и, следовательно, дает возможность идентифицировать индивидуальные хромосомы, уточнить их число и размер и в конечном итоге получить весьма полное представление о хромосомном

наборе организма. С помощью метода KARD 2-D PFGE были идентифицированы хромосомы в молекулярных кариотипах аскомицетов *Saccharomyces cerevisiae* и *Pneumocystis carinii* (Brugère et al., 2000b; Cornillot et al., 2002), а также у целого ряда микроспоридий (Brugère et al., 2000a; Mansour et al., 2004; Nasonova et al., 2005; Dia et al., 2007).

Только эффективное разделение в геле отдельных полос, использование большого числа зондов и (или) анализ паттернов рестрикции хромосомных ДНК дают определенные гарантии, что обнаружены и точно идентифицированы все хромосомы в исследуемом молекулярном кариотипе. Для некоторых объектов (например, *Trypanosoma* spp.), интенсивно изучаемых в разных лабораториях по всему миру на протяжении десятилетий, число индивидуальных хромосом и число их копий в клетке до сих пор точно неизвестно (Wickstead et al., 2004; El-Sayed et al., 2005).

Для достоверного описания хромосомного набора изучаемого организма весьма желательна (но для многих объектов редко достижима) интеграция данных цитологического и молекулярного подходов к кариотипированию. Подобный интегральный подход применяется при анализе кариотипа ряда грибов, в частности аскомицетов

из подтипа Pezizomycotina. Для последних разработан цитогенетический метод, позволяющий получать высококачественные препараты митотических хромосом при стимуляции разрыва конидиальных проростковых трубок или кончиков молодых гиф (the germ tube burst method, GTBM — Shirane et al., 1989). Сравнение результатов цитогенетического анализа и молекулярного кариотипирования способствует проверке и уточнению полученных обоими методами данных. В частности, применение такого комплексного подхода помогло при анализе препаратов митотических хромосом и молекулярных кариотипов *Erysiphe graminis* (Borbye et al., 1992), *Mycosphaerella graminicola* (Mehrabi et al., 2007) и *Cryphonectria parasitica* (Eusebio-Cope et al., 2009).

Задачи, решаемые с помощью молекулярного кариотипирования

Благодаря методу ПЭФ стало возможным не только определение числа хромосом, но и оценка размера гаплоидного генома (путем суммирования размеров индивидуальных хромосом) у низших эукариот, для многих из которых эти данные не могут быть получены классическими методами цитологии и генетики. Например, с помощью молекулярного кариотипирования было показано, что у эукариотических микроорганизмов число хромосом варьирует в широких пределах: от 3 (у *Schizosaccharomyces pombe* — Smith et al., 1987) до более 100 (у *Trypanosoma brucei* — Melville et al., 1998). Размер генома варьирует от 2.3 млн п. н. (*Encephalitozoon intestinalis* — Peyretailade et al., 1998) до более 80 млн п. н. (*Toxoplasma gondii* — Sibley, Boothroyd, 1992; *Trypanosoma cruzi* — Cano et al., 1995). Путем сравнения оценок размера гаплоидного генома, полученных на основании анализа молекулярного кариотипа, с цитометрическими или биохимическими данными об абсолютном содержании ДНК в ядре можно сделать вывод об уровне пloidности у исследуемого организма (Adam, 2000; Nasonova et al., 2005; Solieri et al., 2008).

Молекулярное кариотипирование позволяет выявлять хромосомные перестройки и изучать связанный с ними феномен хромосомного полиморфизма, который широко распространен среди одноклеточных эукариот. Анализ хромосомных наборов используют для изучения внутри- и межвидовой кариотипической изменчивости и филогенетических построений (например, у трипаносоматид — Henriksson et al., 2002; Dujardin, 2009; Marín et al., 2009; у дрожжей — Solieri et al., 2008), для исследования эволюции хромосом у близких видов, анализа древних хромосомных транслокаций и разработки моделей видообразования (например, у *T. cruzi* — Souza et al., 2011; у *Leishmania* spp. — Britto et al., 1998; у *Saccharomyces* spp. — Dujon, 2006; Fischer et al., 2006). Сравнение молекулярных кариотипов у серий изолятов широко используется в клинической диагностике и сельскохозяйственной микробиологии (Giannini et al., 1986; Taylor et al., 1991; Csoma et al., 2010, и др.).

Молекулярное кариотипирование — весьма эффективный инструмент для уточнения молекулярно-генетических карт и хромосомной идентификации обнаруженных групп сцепления (Tzeng et al., 1992; Zhong et al., 2002), для анализа трансформантов и результатов скрещиваний (Martin, 1995; Zuccaro et al., 2009). ПЭФ незаменим и при реализации проектов по расшифровке геномов

эукариотических микроорганизмов. В частности, на начальных этапах проектов, в которых используется стратегия похромосомного секвенирования (whole-chromosome shotgun sequencing strategy), создают хромосомоспецифичные библиотеки после фракционирования хромосомных ДНК с помощью ПЭФ. Например, такой подход применяли при секвенировании АТ-богатых геномов *Plasmodium falciparum* (22.8 млн п. н., 82 % А+Т, 14 хромосом размером 0.6—3.3 млн п. н. — Gardner et al., 2002), *Dictyostelium discoideum* (34 млн п. н., 77 % А+Т, 6 хромосом размером 4—7 млн п. н. — Eichinger et al., 2005), при секвенировании генома микроспоридии *Encephalitozoon cuniculi* (Katinka et al., 2001).

В тех случаях, когда используют стратегии тотального секвенирования генома (whole genome sequencing strategies), сведения о хромосомном наборе, размере хромосом и хромосомоспецифичных маркерах оказываются своего рода зацепкой, весьма полезной для упорядочивания данных, полученных в ходе секвенирования. В частности, хромосомную привязку YAC-контингов для последующей хромосомной локализации whole genome shotgun-последовательностей *T. cruzi* осуществляли с помощью дот-гибридизации с хромосомоспецифичными маркерами (Santos et al., 2006). Для упорядочивания космидных библиотек, используемых в проекте по секвенированию генома *Neurospora crassa*, в качестве зондов использовали фракционированные с помощью ПЭФ и экстрагированные из геля хромосомные ДНК (Kelkar et al., 2001). В рамках проекта по секвенированию генома *Leishmania major* Friedlin для создания физической карты генома и установления хромосомной локализации используемых клонов космид-специфичные зонды гибридизовали с фракционированными с помощью ПЭФ хромосомными ДНК (Ivens et al., 1998).

Внедрение в практику исследований ПЭФ, с помощью которого удастся фракционировать в агарозном геле ДНК целых хромосом, придадо мощный импульс развитию кариологии эукариотических микроорганизмов. В настоящее время молекулярный (или электрофоретический) кариотип описан уже для сотен видов грибов и протистов. Однако во многих работах уделено внимание лишь интерпретации электрофореграмм, в то время как проведение исследования молекулярного кариотипа организма на современном уровне предполагает не только описание особенностей фракционирования хромосомных ДНК, но и идентификацию хромосом, ДНК которых мигрирует в наблюдаемых в геле полосах.

В связи с этим предлагаем следующим образом сформулировать определение понятия «молекулярный кариотип»: это совокупность фенотипических признаков, по которым можно описать и идентифицировать набор хромосомных ДНК, характерный для исследуемого организма (штамма, клона). Сюда входят оценки числа и размера этих молекул, а также сведения об особенностях их фракционирования и идентификации с индивидуальными хромосомами, о наличии комигрирующих негомологичных молекул близкого размера, о числе и сходстве гомологов, о локализации ДНК-зондов, о характерных паттернах рестрикции. Получение подобного набора данных обычно позволяет не только детально описать молекулярный кариотип, но и определить уровень пloidности и размер генома у изучаемого организма.

Автор выражает благодарность А. Л. Юдину и Э. Корнийо (Е. Cornillot) за плодотворное обсуждение

материала и обмен идеями, которые помогли при написании обзора и подготовке рисунка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00943).

Список литературы

- Богданов Ю. Ф., Коломиец О. Л. 2007. Синаптонемный комплекс — индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: Тов. науч. изд. КМК. 358 с.
- Левитский Г. А. 1924. Материальные основы наследственности. Киев: Гос. изд-во Украины. 166 с.
- Левитский Г. А. 1931. Морфология хромосом и понятие «кариотипа» в систематике. Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 27 (1) : 187—240.
- Мажейка И. С., Коломиец О. Л. 2003. Метод получения препаратов синаптонемных комплексов мейотических хромосом из базидиальных протопластов шампиньона *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. Генетика. 39 (3) : 357—361.
- Насонова Е. С. 2008. Пульс-электрофорез: теория метода, инструментальный арсенал и области применения. Цитология. 50 (11) : 927—935.
- Райков И. Б. 1978. Ядро простейших. Морфология и эволюция. Л.: Наука. 328 с.
- Седова Т. В. 1996. Кариология водорослей. СПб.: Наука. 368 с.
- Скарлато С. О. 2000. Примитивные черты структурной организации слабоконденсирующихся хромосом простейших. Цитология. 42 (3) : 309.
- Соколова Ю. Я., Насонова Е. С., Сомова Н. В., Скарлато С. О. 1998. Ультраструктура ядерного аппарата и электрофоретический кариотип микроспоридии *Nosema grylli* — внутриклеточного паразита сверчка *Gryllus bimaculatus*. Цитология. 40 (5) : 407—416.
- Adam R. D. 2000. The *Giardia lamblia* genome. Int. J. Parasitol. 30 : 475—484.
- Adam R. D., Nash T. E., Wellems T. E. 1988. The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. Nucl. Acids Res. 16 : 4555—4567.
- Bartholdi M. F. 1990. Flow cytogenetics. Pathobiology. 58 : 118—128.
- Bastien P., Blaineau C., Pagès M. 1992. Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. In: Subcellular biochemistry. New York: Plenum Press. 18 : 131—187.
- Beadle J., Wright M., McNeely L., Bennett J. W. 2003. Electrophoretic karyotype analysis in fungi. Adv. Appl. Microbiol. 53 : 243—270.
- Biderre C., Duffieux F., Peyretailade E., Glaser F., Peyret P., Danchin A., Pages M., Méténier G., Vivarès C. P. 1997. Mapping of repetitive and non-repetitive DNA probes to chromosomes of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. Gene. 191 : 39—45.
- Biderre C., Pages M., Méténier G., David D., Bata J., Prensier G., Vivarès C. P. 1994. On small genomes in eukaryotic organisms: molecular karyotypes of two microsporidian species (Protozoa) parasites of vertebrates. C. R. Acad. Sci. Paris: Sci. de la vie. 317 : 399—404.
- Boehm E. W. A., Bushnell W. R. 1992. An ultrastructural pachytene karyotype for *Melampsora lini*. Phytopathology. 82 : 1212—1218.
- Borbye L., Linde-Laursen I., Christiansen S. K., Giese H. 1992. The chromosome complement of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* analysed by light microscopy and field inversion gel electrophoresis. Mycol. Res. 96 : 97—102.
- Branche C., Ochaya S., Aslund L., Andersson B. 2006. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 147 : 30—38.
- Braselton J. P. 1982. Karyotypic analysis of *Plasmodiophora brassicae* based on serial thin sections of pachytene nuclei. Can. J. Bot. 60 : 403—408.
- Britto C., Ravel C., Bastien P., Blaineau C., Pages M., Dedet J. P., Wincker P. 1998. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. Gene. 222 : 107—117.
- Brody H., Carbon J. 1989. Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86 : 6260—6263.
- Brugère J. F., Cornillot E., Méténier G., Bensimon A., Vivarès C. P. 2000a. *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) genome: physical map and evidence for telomere-associated rDNA units on all chromosomes. Nucl. Acids Res. 28 : 2026—2033.
- Brugère J. F., Cornillot E., Méténier G., Vivarès C. P. 2000b. In-gel DNA radiolabelling and two-dimensional pulsed field gel electrophoresis procedures suitable for fingerprinting and mapping small eukaryotic genomes. Nucl. Acids Res. 28 : E48.
- Brugère J. F., Cornillot E., Méténier G., Vivarès C. P. 2000c. Occurrence of subtelomeric rearrangements in the genome of the microsporidian parasite *Encephalitozoon cuniculi*, as revealed by a new fingerprinting procedure based on two-dimensional pulsed field gel electrophoresis. Electrophoresis. 21 : 2576—2581.
- Burmeister M., Ulanovsky L. (eds). 1992. Pulsed field gel electrophoresis protocols. Methods and theories. Totowa: Humana Press. 485 p.
- Campbell S. R., van Keulen H., Erlandsen S. L., Senturia J. B., Jarroll E. L. 1990. *Giardia* sp.: comparison of electrophoretic karyotypes. Exp. Parasitol. 71 : 470—482.
- Cano M. I., Gruber A., Vazquez M., Cortés A., Levin M. J., González A., Degraeve W., Rondinelli E., Zingales B., Ramirez J. L., Alonso C., Requena J. M., Franco da Silveira J. 1995. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. Mol. Biochem. Parasitol. 71 : 273—278.
- Carle G. F., Olson M. V. 1985. An electrophoretic karyotype for yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82 : 3756—3760.
- Chu G. 1990. Pulsed-field gel electrophoresis: theory and practice. In: Methods: a companion to methods in enzymology. San Diego: Acad. Press. 1 : 129—142.
- Cleveland L. R. 1958. Movement of chromosomes in *Spirotrichonympha* to centrioles instead of the ends of central spindle. J. Protozool. 5 : 63—68.
- Corcoran L. M., Forsyth K. P., Bianco A. E., Brown G. V., Kemp D. J. 1986. Chromosome size polymorphisms in *Plasmodium falciparum* can involve deletions and are frequent in natural parasite populations. Cell. 44 : 87—95.
- Cornillot E., Keller B., Cushion M. T., Metenier G., Vivarès C. P. 2002. Fine analysis of the *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* genome by two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis. Gene. 293 : 87—95.
- Covert S. F. 1998. Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. Curr. Genet. 33 : 311—319.
- Craig J. M., Bickmore W. A. 1993. Chromosome bands — flavours to savour. BioEssays. 15 : 349—354.
- Csoma H., Zakany N., Capece A., Romano P., Sipiczki M. 2010. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis. Int. J. Food Microbiol. 140 : 239—248.
- Del Cacho E., Pages M., Gallego M., Monteagudo L., Sánchez-Acedo C. 2005. Synaptonemal complex karyotype of *Eimeria tenella*. Int. J. Parasitol. 35 : 1445—1451.
- Dia N., Lavie L., Méténier G., Toguebaye B. S., Vivarès C. P., Cornillot E. 2007. InterB multigenic family, a gene repertoire associated with subterminal chromosome regions of *Encephalitozoon cuniculi* and conserved in several human-infecting microsporidian species. Curr. Genet. 51 : 171—186.
- Dujardin J. C. 2009. Structure, dynamics and function of *Leishmania* genome: resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? Infect. Genet. Evol. 9 : 290—297.
- Dujon B. 2006. Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. Trends Genet. 22 : 375—387.

- Dunn P. P., Stephens P. J., Shirley M. W. 1998. *Eimeria tenella*: two species of extrachromosomal DNA revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *Parasitol. Res.* 84 : 272—275.
- Eichinger L., Pachebat J. A., Glockner G. et al. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. 435 : 43—57.
- El-Sayed N. M., Myler P. J., Bartholomeu D. C. et al. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309 : 409—415.
- Eusebio-Cope A., Suzuki N., Sadeghi-Garmaroodi H., Taga M. 2009. Cytological and electrophoretic karyotyping of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* 46 : 342—351.
- Fan J.-B., Chikashige Y., Smith C. L., Niwa O., Yanagida M., Cantor C. R. 1989. Construction of a *NotI* restriction map of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Nucl. Acids Res.* 17 : 2801—2818.
- Fan J.-B., Grothues D., Smith C. L. 1991. Alignment of *SfiI* sites with the *NotI* restriction map of *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Nucl. Acids Res.* 19 : 6289—6294.
- Fischer G., Rocha E. P., Brunet F., Vergassola M., Dujon B. 2006. Highly variable rates of genome rearrangements between hemiascomycetous yeast lineages. *PLoS Genet.* 2 : 0253—0261.
- Fraissinet-Tachet L., Reymond-Cotton P., Fevre M. 1996. Molecular karyotype of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Genet.* 29 : 496—501.
- Gardner M. J., Hall N., Fung E. et al. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 419 : 498—511.
- Giannini S. H., Schittini M., Keithly J. S., Warburton P., Cantor C. R., Van der Ploeg L. H. T. 1986. Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis. *Science*. 232 : 761—765.
- Gillies C. B. 1972. Reconstruction of the *Neurospora crassa* pachytene karyotype from serial sections of synaptonemal complexes. *Chromosoma*. 36 : 119—130.
- Graf H., Sokolowski F., Klewer A., Diederichsen E., Luerßen H., Siemens J. 2001. Electrophoretic karyotype of the obligate biotrophic parasite *Plasmodiophora brassicae* Wor. *J. Phytopathol.* 149 : 313—318.
- Grassé P.-P., Hollande A. 1963. Les flagellés des genres *Holomastigotoides* et *Rostronympha*. Structure et cycle de spiralisations des chromosomes chez *Holomastigotoides psammotermidis*. *Ann. Sci. Natur., Zool.* 12 : 749—792.
- Grell K. G. 1957. Untersuchungen über die Fortpflanzung und Sexualität der Foraminiferen. I. *Rotaliella roscoffensis*. *Arch. Protistenk.* 102 : 147—164.
- Grimont F., Grimont P. A. D. 1991. DNA fingerprinting. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley. 249—279.
- Hagenkord J. M., Parwani A. V., Lyons-Weiler M. A., Alvarez K., Amato R., Gatalica Z., Gonzalez-Berjon J. M., Peterson L., Dhir R., Monzon F. A. 2008. Virtual karyotyping with SNP microarrays reduces uncertainty in the diagnosis of renal epithelial tumors. *Diagn. Pathol.* 3 : 44.
- Hansen E. M., Brasier C. M., Shaw D. S., Hamm P. B. 1986. The taxonomic structure of *Phytophthora megasperma*: evidence for emerging biological species groups. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 87 : 557—573.
- Henriksson J., Dujardin J. C., Barnabe C., Brisse S., Timperman G., Venegas J., Pettersson U., Tibayrenc M., Solari A. 2002. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology*. 124 : 277—286.
- Hernandez-Rivas R., Scherf A. 1997. Separation and mapping of chromosomes of parasitic protozoa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 92 : 815—819.
- Hornok L. 1999. Chromosomes, karyotype analysis, chromosome rearrangements in fungi. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 46 : 273—278.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409 : 860—921.
- Ivens A. C., Lewis S. M., Bagherzadeh A., Zhang L., Chan H. M., Smith D. F. 1998. A physical map of the *Leishmania major* Friedlin genome. *Genome Res.* 8 : 135—145.
- Jones C. P., Janson M., Nordenskjöld M. 1989. Separation of yeast chromosomes in the megabase range suitable as size markers for pulsed-field gel electrophoresis. *Technique*. 1 : 90—95.
- Jones S. H., Lew A. E., Jorgensen W. K., Barker S. C. 1997. *Babesia bovis*: genome size, number of chromosomes and telomeric probe hybridisation. *Int. J. Parasitol.* 27 : 1569—1573.
- Katinka M. D., Duprat S., Cornillot E., Méténier G., Thoma-rat F., Prensier G., Barbe V., Peyretaillade E., Brottier P., Winkler P., Delbac F., El Alaoui H., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivarès C. P. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 414 : 450—453.
- Kelkar H. S., Griffith J., Case M. E., Covert S. F., Hall R. D., Keith C. H., Oliver J. S., Orbach M. J., Sachs M. S., Wagner J. R., Weise M. J., Wunderlich J. K., Arnold J. 2001. The *Neurospora crassa* genome: cosmid libraries sorted by chromosome. *Genetics*. 157 : 979—990.
- Kemp D. J., Thompson J. K., Walliker D., Corcoran L. M. 1987. Molecular karyotype of *Plasmodium falciparum*: conserved linkage groups and expendable histidine-rich protein genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 84 : 7672—7676.
- Le Blancq S. M., Adam R. D. 1998. Structural basis of karyotype heterogeneity in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97 : 199—208.
- Le Blancq S. M., Korman S. H., Van der Ploeg L. H. 1991. Frequent rearrangements of rRNA-encoding chromosomes in *Giardia lamblia*. *Nucl. Acids Res.* 19 : 4405—4412.
- Le Blancq S. M., Korman S. H., Van der Ploeg L. H. 1992. Spontaneous chromosome rearrangements in the protozoan *Giardia lamblia*: estimation of mutation rates. *Nucl. Acids Res.* 20 : 4539—4545.
- Lehker M. W., Alderete J. F. 1999. Resolution of six chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and conservation of size and number among isolates. *J. Parasitol.* 85 : 976—979.
- Lie T., Laane M. M. 1982. Reconstruction analyses of synaptonemal complexes in haploid and diploid pachytene nuclei of *Physarum polycephalum* (Myxomycetes). *Hereditas*. 96 : 119—140.
- Link A. J., Olson M. V. 1991. Physical map of the *Saccharomyces cerevisiae* genome at 110-kilobase resolution. *Genetics*. 127 : 681—698.
- Malone L. A., McIvor C. 1993. Pulsed-field gel electrophoresis of DNA from four microsporidian isolates. *J. Invertebr. Pathol.* 61 : 203—205.
- Mansour L., Cheikali C., Desauvais P., Coulon J. P., Daubin J., Hassine O. K., Vivares C. P., Jeanjean J., Cornillot E. 2004. Description of an ultrathin multiwire proportional chamber-based detector and application to the characterization of the *Spraguea lophii* (Microspora) two-dimensional genome fingerprint. *Electrophoresis*. 25 : 3365—3377.
- Marin C., Alberge B., Dollet M., Pagès M., Bastien P. 2008. First complete chromosomal organization of a protozoan plant parasite (*Phytomonas* spp.). *Genomics*. 91 : 88—93.
- Marin C., Dollet M., Pagès M., Bastien P. 2009. Large differences in the genome organization of different plant *Trypanosomatid* parasites (*Phytomonas* spp.) reveal wide evolutionary divergences between taxa. *Infect. Genet. Evol.* 9 : 235—240.
- Maringele L., Lydall D. 2006. Pulsed-field gel electrophoresis of budding yeast chromosomes. *Methods Mol. Biol.* 313 : 65—73.
- Martin F. 1995. Meiotic instability of *Pythium sylvaticum* as demonstrated by inheritance of nuclear markers and karyotype analysis. *Genetics*. 139 : 1233—1246.
- Maule J. 1994. Electrophoretic karyotype analysis. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* 29 : 221—252.
- Maule J. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis. *Mol. Biotech.* 9 : 107—126.
- Mehrabi R., Taga M., Kema G. H. J. 2007. Electrophoretic and cytological karyotyping of the foliar wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals many chromosomes with a large size range. *Mycologia*. 99 : 868—876.

- Melville S. E., Leech V., Gerrard C. S., Tait A., Blackwell J. M. 1998. The molecular karyotype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* and the assignment of chromosome markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94 : 155—173.
- Melville S. E., Leech V., Navarro M., Cross G. A. 2000. The molecular karyotype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* stock 427. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111 : 261—273.
- Mills D., McCluskey K. 1990. Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3 : 351—357.
- Moens P. B., Perkins F. O. 1969. Chromosome number of a small protist: accurate determination. *Science.* 166 : 1289—1291.
- Moses M. J., Counce S. J. 1974. Synaptonemal complex karyotyping in spreads of mammalian spermatocytes. In: *Mechanisms in recombination*. New York: Plenum Publ. Corp. 385—390.
- Nassanova E., Cornillot E., Méténier G., Agafonova N., Kudryavtsev B., Skarlato S., Vivarès C. P. 2005. Chromosomal composition of the genome in the monomorphic diplokaryotic microsporidium *Paranosema grylli*: analysis by two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis. *Folia Parasitol.* 52 : 145—157.
- Orbach M. J., Vollrath D., Davis R. W., Janofsky C. 1988. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 1469—1473.
- Pantou M. P., Typas M. A. 2005. Electrophoretic karyotype and gene mapping of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 245 : 213—220.
- Papa K. E. 1976. Linkage groups in *Aspergillus flavus*. *Mycologia.* 68 : 159—165.
- Peterson J. B., Ris H. 1976. Electron-microscopic study of the spindle and chromosome movement in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 22 : 219—242.
- Peyretailade E., Bidere C., Peyret P., Duffieux F., Méténier G., Gouy M., Michot B., Vivarès C. P. 1998. Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Nucl. Acids Res.* 26 : 3513—3520.
- Pinevitch A., Gromov B., Mamkaeva K., Nasonova E. 1997. Study of molecular karyotypes in *Amoebophilidium protococcarum*, the endotrophic parasite of chlorophycean alga *Scenedesmus*. *Curr. Microbiol.* 34 : 122—126.
- Porcile P. E., Santos M. R., Souza R. T., Verbisck N. V., Brandao A., Urmenyi T., Silva R., Rondinelli E., Lorenzi H., Levin M. J., Degraeve W., Franco da Silveira J. 2003. A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. *Gene.* 308 : 53—65.
- Prensier G., Slomianny C. 1986. The karyotype of *Plasmodium falciparum* determined by ultrastructural serial sectioning and 3D reconstruction. *J. Parasitol.* 72 : 731—736.
- Pukkila P. J., Lu B. C. 1985. Silver staining of meiotic chromosomes in the fungus, *Coprinus cinereus*. *Chromosoma.* 91 : 108—112.
- Raikov I. B. 1982. The protozoan nucleus. Morphology and evolution. Wien; New York: Springer Verlag. 474 p.
- Riveron A. M., Lopez-Canovas L., Baez-Camargo M., Flores E., Perez-Perez G., Luna-Arias J. P., Orozco E. 2000. Circular and linear DNA molecules in the *Entamoeba histolytica* complex molecular karyotype. *Eur. Biophys. J.* 29 : 48—56.
- Robson G. E., Williams K. L. 1977. The mitotic chromosomes of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*: a karyotype based on Giemsa banding. *J. Gen. Microbiol.* 99 : 191—200.
- Santos M. R., Barros R. R., Porcile P. E., Levin M. J., da Silveira J. F. 2006. Contribution of yeast artificial chromosome-based physical maps to the final assembly of the *Trypanosoma cruzi* genome. *Methods Mol. Biol.* 349 : 187—197.
- Schröck E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M. A., Ning Y., Ledbetter D. H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science.* 273 : 494—497.
- Schwartz D. C., Cantor C. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37 : 67—75.
- Shirane N., Masuko M., Hayashi Y. 1989. Light microscopic observation of nuclei and mitotic chromosomes of *Botrytis* species. *Phytopathology.* 79 : 728—730.
- Shirley M. W., Kemp D. J., Pallister J., Prowse S. J. 1990. A molecular karyotype of *Eimeria tenella* as revealed by contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38 : 169—173.
- Sibley L. D., Boothroyd J. C. 1992. Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51 : 291—300.
- Singh R. J. 2003. Plant cytogenetics. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 463 p.
- Skinner D. Z., Budde A. D., Leong S. A. 1991. Molecular karyotype analysis in fungi. In: *More gene manipulations in fungi*. San Diego: Acad. Press. 86—102.
- Smith C. L., Matsumoto T., Niwa O., Klco S., Fan J. B., Yanagida M., Cantor C. R. 1987. An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 15 : 4481—4489.
- Solieri L., Cassanelli S., Croce M. A., Giudici P. 2008. Genome size and ploidy level: new insights for elucidating relationships in *Zygosaccharomyces* species. *Fungal Genet. Biol.* 45 : 1582—1590.
- Souza R. T., Lima F. M., Barros R. M., Cortez D. R., Santos M. F., Cordero E. M., Ruiz J. C., Goldenberg S., Teixeira M. M., da Silveira J. F. 2011. Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* 6 : e23042.
- Sugang R., Chen G., Liu W., Lindsay R., Lu J., Muzny D., Shaulsky G., Loomis W., Gibbs R., Kuspa A. 2003. Sequence and structure of the extrachromosomal palindrome encoding the ribosomal RNA genes in *Dictyostelium*. *Nucl. Acids Res.* 31 : 2361—2368.
- Taga M., Murata M. 1994. Visualization of mitotic chromosomes in filamentous fungi by fluorescence staining and fluorescence in situ hybridization. *Chromosoma.* 103 : 408—413.
- Taylor J. L., Borgmann I., Séguin-Swartz G. 1991. Electrophoretic karyotyping of *Leptosphaeria maculans* differentiates highly virulent from weakly virulent isolates. *Curr. Genet.* 19 : 273—277.
- Tzeng T., Lyngholm L. K., Ford C. F., Bronson C. R. 1992. A restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Genetics.* 130 : 81—96.
- Van der Ploeg L. H., Cornelissen A. W., Barry J. D., Borst P. 1984. Chromosomes of kinetoplastida. *EMBO J.* 3 : 3109—3115.
- Van der Ploeg L. H. T., Gottesdiener K. M., Korman S. H., Weiden M., Le Blancq S. 1992. Protozoan genomes. Karyotype analysis, chromosome structure and chromosome specific libraries. *Methods Mol. Biol.* 12 : 203—223.
- Verdoes J. C., Calil M. R., Punt P. J., Debets F., Swart K., Stouthamer A. H., van den Hondel C. A. 1994. The complete karyotype of *Aspergillus niger*: the use of introduced electrophoretic mobility variation of chromosomes for gene assignment studies. *Mol. Gen. Genet.* 244 : 75—80.
- Vermeesch J. R., Fiegler H., de Leeuw N. et al. 2007. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 15 : 1105—1114.
- Vollrath D., Davis R. W. 1987. Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour clamped homogeneous electric fields. *Nucl. Acids Res.* 15 : 7865—7876.
- Vollrath D., Davis R. W., Connelly C., Hieter P. 1988. Physical mapping of large DNA by chromosome fragmentation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85 : 6027—6031.
- Wang T. L., Maierhofer C., Speicher M. R., Lengauer C., Vogelstein B., Kinzler K. W., Velculescu V. E. 2002. Digital karyotyping. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 16 156—16 161.
- White M. J. D. 1973. The chromosomes. 6th ed. London: Chapman & Hall. 214 p.
- Wickstead B., Ersfeld K., Gull K. 2004. The small chromosomes of *Trypanosoma brucei* involved in antigenic variation are constructed around repetitive palindromes. *Genome Res.* 14 : 1014—1024.

- Wieloch W. 2006. Chromosome visualisation in filamentous fungi. *J. Microbiol. Methods*. 67 : 1—8.
- Willhoeft U., Tannich E. 1999. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99 : 41—53.
- Wincker P., Ravel C., Blaineau C., Pages M., Jauffret Y., Dedet J. P., Bastien P. 1996. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucl. Acids Res.* 24 : 1688—1694.
- Wincker P., Ravel C., Britto C., Dubessay P., Bastien P., Pagès M., Blaineau C. 1997. A direct method for the chromosomal assignment of DNA markers in *Leishmania*. *Gene*. 194 : 77—80.
- Zhong S., Steffenson B. J., Martinez J. P., Ciuffetti L. M. 2002. A molecular genetic map and electrophoretic karyotype of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15 : 481—492.
- Zolan M. E. 1995. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol. Rev.* 59 : 686—698.
- Zubáková Z., Cimbůrek Z., Tachezy J. 2008. Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 161 : 49—54.
- Zuccaro A., Basiewicz M., Zurawska M., Biedenkopf D., Kogel K. H. 2009. Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*. *Fungal Genet. Biol.* 46 : 543—550.

Поступила 11 VI 2012

MOLECULAR KARYOTYPING OF EUKARYOTIC MICROORGANISMS

E. S. Nasonova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: nosema@mail.ru

In many fungi and protists small size and weak morphological differentiation of chromosomes embarrass the study of karyotypes using microscopical tools. Molecular karyotyping based on the fractionation of intact chromosomal DNAs by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) provides an alternative approach to the analysis of chromosomal sets in such organisms. To assign the bands observed in PFGE gel to the individual chromosomes the following methods of chromosome identification are applied: densitometric analysis of the bands; Southern hybridization with chromosome- and telomere-specific probes, which often is combined with comparative karyotyping of a series of strains with pronounced size polymorphism of chromosomes; comparison of the patterns of restriction fragments of chromosomal DNAs fractionated by KARD 2-D PFGE; comparison with the strains with well-studied interchromosomal rearrangements. Besides estimation of the number and the size of chromosomes, molecular karyotyping allows assessment of haploid genome size and ploidy level, study of genome dynamics, identification of chromosomal rearrangements and associated chromosomal polymorphism. The analysis of karyotype and dynamics of the genomes is important for the study of intra- and interspecific variability, investigation of the chromosome evolution in closely related species and elaboration of the models of speciation. The comparison of molecular karyotypes among isolates of different origin is of great practical importance for clinical diagnostics and for agricultural microbiology.

In this review we discuss: 1) the methods of karyotyping and their application to the analysis of chromosomal sets in eukaryotic microorganisms; 2) the specificity of the methods used for extraction and fractionation of intact chromosomal DNAs; 3) the reasons for difficulties in interpretation of molecular karyotypes and the ways of their overcoming; 4) fields of application of molecular karyotyping; 5) the definition of «molecular karyotype» formulated in accordance with modern methodological requirements.

Key words: molecular karyotype, electrophoretic karyotype, chromosomal DNA, chromosomes, chromosomal polymorphism, unicellular eukaryotes, protists, fungi.