

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДОБАВОЧНЫХ ХРОМОСОМ

© А. И. Макунин,<sup>1, 2, \*</sup> В. А. Трифонов<sup>1, 3</sup><sup>1</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск,<sup>2</sup> Центр геномной биоинформатики им. Феодосия Добжанского

С.-Петербургского государственного университета

и <sup>3</sup> Новосибирский государственный университет;

\* электронный адрес: alex.makunin@gmail.com

Новейшие данные по секвенированию и анализу некодирующей части генома раскрыли неожиданные биологические функции у последовательностей, прежде считавшихся «избыточными». В настоящем обзоре мы рассматриваем эволюцию подходов к изучению сверхчисленных элементов генома — В-хромосом — от методов классической цитогенетики до новейших технологий полногеномного анализа и обсуждаем перспективы вовлечения в геномные проекты новых видов с добавочными хромосомами.

Ключевые слова: добавочные хромосомы, полногеномное секвенирование, анализ генома.

Принятые сокращения: п. н. — пара нуклеотидов, ПЦР — полимеразная цепная реакция, BAC — bacterial artificial chromosome (бактериальная искусственная хромосома), FISH — fluorescent *in situ* hybridization (флуоресцентная гибридизация *in situ*).

Несмотря на возросший интерес к вариабельным и некодирующим частям генома (Khatun, 2012), В-хромосомы остаются загадочной и малоисследованной частью эукариотического кариотипа. Высокая вариабельность добавочных хромосом прослеживается на уровне популяций, индивидуумов, тканей и клеток и связана с нестабильным поведением В-хромосом в клеточном делении. Хотя добавочные элементы генома и не являются необходимыми для нормального развития и репродукции, они сохраняются в геномах отдельных видов на протяжении сотен тысяч или даже миллионов лет (Lamb et al., 2007; Teruel et al., 2010). Важным и зачастую нерешенным остается вопрос о функциональности добавочных хромосом. Влияние добавочных хромосом на фенотип показано для растений (Dherawattana, Sadanaga, 1973) и грибов (Miao et al., 1991a, 1991b; Han et al., 2001). Недавно появились работы по обнаружению генов на добавочных хромосомах позвоночных (Graphodatsky et al., 2005; Yudin et al., 2007; Duke Becker et al., 2011; Yoshida et al., 2011), однако вопрос об их транскрипционной активности и влиянии на фенотип остается открытым.

Настоящий обзор посвящен сравнению классических цитогенетических и современных молекулярно-биологических подходов, использующихся для изучения добавочных хромосом, а также обсуждаются перспективы использования новейших технологий для изучения В-хромосом.

### Классические цитогенетические методы

К настоящему времени наличие В-хромосом показано для 75 из примерно 5000 описанных видов млекопитающих (данные Лаборатории цитогенетики животных ИМКБ СО РАН, Новосибирск). Для сравнения, по оценке

Джонса (Jones, 1995), около 15 % покрытосеменных растений имеют В-хромосомы. Такое различие может быть объяснено меньшей толерантностью генома млекопитающих к добавочным элементам (Vujosević, Blagojević, 2004).

Работы по кариотипированию позволяют выявить сверхчисленные хромосомы и определить их количество и размер. Число добавочных хромосом сильно варьирует. У многих видов это всего лишь 1 хромосома, изредка наблюдаемая у отдельных особей (так, у человека образуются микрохромосомы с частотой 0.044 % (Liehr et al., 2008)), у некоторых видов добавочные хромосомы присутствуют почти у всех особей, иногда в большом количестве (число может достигать 38 у копытного лемминга *Dicrostonyx torquatus* (Чернявский, Козловский, 1980)). Размеры В-хромосом также бывают различными: от мини-хромосом (Graphodatsky, 1990) до гигантских, сравнимых по размеру с самыми крупными хромосомами основного набора. Среди млекопитающих крупные добавочные хромосомы описаны у грызунов *Uromys caudimaculatus* (Baverstock et al., 1976), *Holochilus brasiliensis* (Nachman, 1992) и *Apodemus peninsulae* (Kartavtseva et al., 2000) и енотовидных собак *Nyctereutes procyonoides* (Ward et al., 1987). Самые крупные В-хромосомы среди позвоночных описаны у уклеи *Alburnus alburnus* (Ziegler et al., 2003). Вариабельность добавочных хромосом детально изучают на популяционном уровне (Гилева, 2004; Rubtsov et al., 2004). Однако разное количество добавочных хромосом можно обнаружить и внутри одного индивида — мозаицизм описан, например, у лисицы *Vulpes vulpes* (Беляев и др., 1974), восточноазиатской лесной мыши *Apodemus peninsulae* (Рослик, Картавцева, 2009), плоскоиглового бандикута *Echymipera kalabu* (Hayman et al., 1969) и японской енотовидной собаки *Nyctereutes*

*procyonoides viverrinus* (Yosida, Wada, 1984). Необычно поведение добавочных хромосом в мейозе: они могут как элиминироваться, так и накапливаться, иногда с крайне высокой эффективностью. Так, у паразитической осы *Nasonia vitripennis* наследование добавочной хромосомы достигает 100 % (наследование хромосом основного набора — 50 %) (Werren, 1991).

У значительного числа видов добавочные хромосомы являются выраженными гетерохроматиновыми элементами, которые выявляются с помощью С-окрашивания (Patton 1972; Raman, Sharma, 1974), тогда как у некоторых других видов (например, сибирской косули *Capreolus pygargus*) добавочные хромосомы не содержат плотных блоков С-гетерохроматина (Demytyeva et al., 2010). Активность рибосомальных генов выявлена окрашиванием серебром на В-хромосомах у восточноазиатской лесной мыши *A. peninsulae* (Rubtsov et al., 2004).

### Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)

Гибридизацией с известными последовательностями на В-хромосомах были обнаружены различные повторенные последовательности: 1) тандемные повторы у лисицы (Потапов и др., 1990); 2) рибосомные гены у черной крысы *Rattus rattus* (Stitou et al., 2000), восточноазиатской лесной мыши *A. peninsulae* (Rubtsov et al., 2004), китайской енотовидной собаки *Nyctereutes procyonoides viverrinus* (Szczerbal, Switonski, 2003) и кузнечика *Eyprepocnemis plorans* (López-León et al., 1994); 3) интерстициальные блоки теломерной ДНК по всей длине В-хромосом китайской енотовидной собаки (Wurster-Hill et al., 1988); 4) LINE и SINE у западного хомячка *Reithrodontomys megalotis* (Peppers et al., 1997); 5) неактивные кластеры гистоновых генов *H3-H4* у саранчи *Locusta migratoria* (Teruel et al., 2010); 6) центромерные последовательности у сумчатой летяги *Petauroides volans* (McQuade et al., 1994) и западного хомячка *Reithrodontomys megalotis* (Peppers et al., 1997).

### Секвенирование и полногеномный анализ

Существует несколько примеров случайного обнаружения ретротранспозонов на добавочных хромосомах, например у уклейки и кукурузы. У уклейки *Alburnus alburnus* при анализе AFLP (amplification fragment length polymorphism) один из фрагментов оказался специфичным для особей с В-хромосомами. Последовательность этого фрагмента оказалась гомологичной ретротранспозону *Gypsy* дрозофилы (Ziegler et al., 2003). В случае с кукурузой В-специфичный фрагмент был обнаружен при Саузерн-блоттинге. Этот фрагмент был картирован в гетерохроматиновой области В-хромосомы, при секвенировании в нем был обнаружен ретротранспозон, а активность этого транспозона была показана методом ПЦР с обратной транскрипцией (Lamb et al., 2007).

У млекопитающих впервые уникальный ген был обнаружен на В-хромосомах лисицы при картировании ее генома ВАС-клонами собаки методом FISH. Клон, содержащий протоонкоген *cKIT*, был локализован как на аутозомах, так и на В-хромосомах. Позднее этот же ВАС-клон был локализован и на В-хромосомах китайской и японской енотовидных собак (Graphodatsky et al., 2005). Наличие гена подтвердили ПЦР-картированием,

размер района дупликации был оценен как не менее 480 т. п. н. (Yudkin et al., 2007). В 2011 г. в аналогичном проекте по созданию хромосомных карт хищных (Duke Becker et al., 2011) тем же методом FISH на В-хромосомах лисицы и енотовидных собак было локализовано уже несколько ВАС-клонов, содержащих до 14 генов из 10 аутосомных регионов. Примечательно, что 6 из обнаруженных в этих исследованиях генов связаны с онкогенезом: *KDR* у обоих подвидов енотовидной собаки (Yudkin et al., 2007), *RET* и *LRIG1* у китайской енотовидной собаки, *LRP1B* и *CTNND2* у лисицы (Duke Becker et al., 2011) и *cKIT* у всех исследованных видов (Graphodatsky et al., 2005).

У пецилии *Poecilia formosa* отмечается связь экспрессии гена пигментации с наличием В-хромосом в кариотипе (Schartl et al., 1995), кроме того, была показана связь В-хромосом с вероятностью возникновения опухолей (Schartl et al., 1997). В недавнем исследовании (Lamatsch et al., 2011) при изучении AFLP на В-хромосоме был обнаружен уникальный участок, присутствующий в основном геноме представителей рода *Poecilia*. Идентифицировать участок поиском гомологов в GenBank не удалось.

В исследовании добавочных хромосом цихлид вида *Lithochromis rubripinnis* (Yoshida et al., 2011) была обнаружена популяция, в которой добавочные хромосомы присутствуют только у самок. Из библиотеки ВАС-клонов родственного вида *Haplochromis chilotes* (также содержащего В-хромосомы) был отобран клон длиной приблизительно 128 т. п. н., содержащий В-специфичный повтор *Vseq1*. В результате его секвенирования было выявлено 5 генов без нонсенс-мутаций, ни один из которых не был связан с определением пола. Методом ПЦР в реальном времени было показано, что один из генов — *ihhb* — присутствует на В-хромосоме в большом количестве копий (>40). Методом FISH ВАС-клон был локализован на коротком плече хромосомы 1 *L. rubripinnis*.

В исследовании на ржи *Secale cereale* (Martis et al., 2012) был проведен хромосомный сортинг для разделения В-хромосом и хромосом основного набора, после чего оба пула были отсекарованы с 0.9-кратным покрытием на платформе Roche 454. В результате анализа последовательностей выяснилось, что В-хромосомы по сравнению с А-хромосомами обогащены фрагментами генов, кодирующих белок, а также митохондриальными и пластидными последовательностями. Частота мутаций в кодирующих белок последовательностях на В-хромосомах оказалась заметно больше, чем на А-хромосомах (1/47 п. н. против 1/72 п. н.). В то же время частота мутаций в мобильных элементах была примерно одинакова: 1/26 п. н. на В-хромосомах, 1/25 п. н. на А-хромосомах. Возраст В-хромосом, который удалось оценить по дивергенции последовательностей генов, составляет 1.1—1.3 млн лет (Martis et al., 2012). По мнению авторов, оценка завышена из-за снижения давления отбора на В-хромосомах. При выравнивании генов В-хромосом против генома ячменя были обнаружены 4 крупных региона соответствия наряду с многочисленными случайными участками, распределенными по всему геному.

В нашей лаборатории были получены результаты, свидетельствующие о наличии уникальных генов на добавочных хромосомах косули, лемминга и мазама путем изучения последовательностей DOP (degenerate oligonucleotide primer) — амплифицированных библиотек сортированных хромосом (неопубликованные данные).

## Перспективы

Наиболее многообещающим выглядит непосредственное изучение нуклеотидной последовательности В-хромосом методами полногеномного секвенирования. Существуют два основных метода изоляции хромосом: 1) хромосомный сортинг, по своей сути представляющий собой усложненный вариант проточной цитометрии (Gray et al., 1975; Stubblefield et al., 1975) и позволяющий получить большое количество ( $10^3$ — $10^5$ ) хромосом, но всегда с контаминацией фрагментами других хромосом и митохондриальной ДНК (Ibrahim, Van den Engh, 2004); 2) микродиссекция, позволяющая выделить не только хромосомы, но и их фрагменты в небольшом количестве (Scalenghe et al., 1981; Weimer et al., 1999); при этом возникает необходимость в амплификации для их дальнейшего применения для секвенирования (Weise et al., 2009).

Для амплификации применяются следующие методы: 1) DOP (degenerate oligonucleotide primer) амплификация — ПЦР с частично вырожденными праймерами (Telenius et al., 1992) — этот метод часто используют для создания хромосомоспецифичных проб для FISH (Trifonov et al., 2002); 2) метод MDA (multiple displacement amplification) — амплификация с помощью полимеразы  $\Phi$ 29 и случайных гексапраймеров (Dean et al., 2002), используемый для секвенирования геномов отдельных клеток (Spits et al., 2006).

Современные технологии секвенирования позволяют с достаточно небольшими затратами получить данные о последовательностях длиной до нескольких миллиардов п. н. (Metzker, 2009), что недостаточно для полноценной сборки генома, но вполне приемлемо для секвенирования хромосомоспецифичных библиотек с небольшим покрытием. Основной проблемой при анализе получаемых данных является наличие качественной сборки и аннотации генома близкородственного вида для проведения эффективного выравнивания и предсказания возможных функций обнаруживаемых элементов. Здесь могут помочь проекты вроде Genome 10K (Haussler et al., 2009) для позвоночных, нацеленные на секвенирование, сборку и аннотацию геномов представителей основных таксонов.

В применении к В-хромосомам методы полногеномного секвенирования позволяют получать лишь примерное представление об их составе. Сборка полной последовательности необходима для уточнения взаимного расположения генов и регуляторных элементов, равно как для отслеживания точек разрыва. Эта задача все еще остается нерешенной, так как она требует проведения целенаправленного картирования. В современных работах оно проводится лишь для оценки размера уникальных последовательностей (Yudkin et al., 2007; Duke Becker et al., 2011).

Секвенирование добавочных хромосом во многих случаях выявляет фрагменты генов (Duke Becker et al., 2011; Yoshida et al., 2011; Martis et al., 2012). Метод ПЦР в реальном времени позволяет оценить, сколько копий генов присутствует на В-хромосоме (Yoshida et al., 2011). Наличие точечных мутаций в кодирующих областях можно использовать для выяснения наличия транскрипции на В-хромосомах путем секвенирования РНК.

Современные методы позволяют выявлять регионы генома, из которых происходят В-хромосомы. Метод FISH эффективен для локализации специфичных повторов или протяженных фрагментов, а анализ синтении у

близкородственных видов — для уникальных последовательностей, таких как гены, кодирующие белок.

Стоит отметить, что те немногие случаи, в которых исследовали последовательности уникальных генов на добавочных хромосомах, показали значительную гетерогенность состава добавочных хромосом разных видов, а иногда и внутриклеточную неоднородность В-хромосом (Trifonov et al., 2002). Эти данные подчеркивают необходимость вовлечения большего числа видов в изучение структуры добавочных хромосом для понимания происхождения и эволюции этих загадочных структур.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований и СО РАН.

## Список литературы

- Беляев Д. К., Волобуев В. Т., Раджабли С. И., Трут Л. Н. 1974. Полиморфизм и мозаицизм по добавочным хромосомам у серебристо-черных лисиц. Генетика. 10 (2) : 58—67.
- Гилева Е. А. 2004. Система В-хромосом у копытных леммингов *Dicrostonyx torquatus* Pall., 1779 из природных и лабораторных популяций. Генетика. 40 (12) : 1686—1694.
- Потапов В. А., Соловьев В. В., Ромащенко А. Г., Сосновцев С. В., Иванов С. В. 1990. Особенности структуры и эволюции сложных, tandemно организованных, Vsp повторов генома лисицы. I. Структура и внутренняя организация BamHI-димера. Молекуляр. биол. 24 (6) : 1649—1665.
- Рослик Г. В., Картавцева И. В. 2009. Полиморфизм и мозаицизм по числу В-хромосом у восточноазиатской мыши *Arodemus peninsulae* (Rodentia) Дальнего Востока России. Цитология. 51 (11) : 929—939.
- Чернявский Ф. Б., Козловский А. И. 1980. Видовой статус и история копытных леммингов (*Dicrostonyx*, Rodentia) острова Врангеля. Зоол. журн. 59 (2) : 266—272.
- Baverstock P. R., Watts C. H., Hogarth J. T. 1976. Heterochromatin variation in the Australian rodent *Uromys caudimaculatus*. Chromosoma. 57 : 397—403.
- Dean F. B., Hosono S., Fang L., Wu X., Faruqi A. F., Bray-Ward P., Sun Z., Zong Q., Du Y., Du J. 2002. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 5261—5266.
- Demytyeva P. V., Trifonov V. A., Kulemzina A. I., Graphodatsky A. S. 2010. Reconstruction of the putative cervidae ancestral karyotype by chromosome painting of siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) with dromedary probes. Cytogen. Gen. Res. 128 : 228—235.
- Dherawattana A., Sadanaga K. 1973. Cytogenetics of a crown rust-resistant hexaploid oat with 42+2 fragment chromosomes. Crop Science. 13 : 591—594.
- Duke Becker S. E., Thomas R., Trifonov V. A., Wayne R. K., Graphodatsky A. S., Breen M. 2011. Anchoring the dog to its relatives reveals new evolutionary breakpoints across 11 species of the Canidae and provides new clues for the role of B chromosomes. Chromosome Res. 19 : 685—708.
- Graphodatsky A. S. 1990. Karyotypical relationships between Cervidae. J. Zool. 69 : 101—114.
- Graphodatsky A. S., Kukekova A. V., Yudkin D. V., Trifonov V. A., Vorobieva N. V., Beklemisheva V. R., Perelman P. L., Graphodatskaya D. A., Trut L. N., Yang F. 2005. The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. Chromosome Res. 13 : 113—122.
- Gray J. W., Carrano A. V., Moore D. H., Steinmetz L. L., Minkler J., Mayal B. H., Mendelsohn M. L., Van Dilla M. A. 1975. High-speed quantitative karyotyping by flow microfluorometry. Clinical Chemistry. 21 : 1258—1262.
- Han Y., Liu X., Benny U., Kistler H. C., VanEtten H. D. 2001. Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernu-

- merary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. *Plant J.* 25 : 305—314.
- Hausler D., O'Brien S. J., Ryder O. A., Barker F. K., Clamp M., Crawford A. J., Hanner R., Hanotte O., Johnson W. E., McGuire J. A. 2009. Genome 10K: a proposal to obtain whole-genome sequence for 10 000 vertebrate species. *J. Heredity.* 100 : 659—674.
- Hayman D. L., Martin P. G., Waller P. F. 1969. Parallel mosaicism of supernumerary chromosomes and sex chromosomes in *Ecymipera kalabu* (Marsupialia). *Chromosoma.* 27 : 371—380.
- Ibrahim S. F., Van den Engh G. 2004. High-speed chromosome sorting. *Chromosome Res.* 12 : 5—14.
- Jones R. N. 1995. Tansley review no. 85. B chromosomes in plants. *New Phytologist.* 131:411—434.
- Kartavtseva I. V., Roslik G. V., Pavlenko M. V., Amachava E. Y., Sawaguchi S., Obara Y. 2000. The B-chromosome system of the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* in the Russian Far East. *Chromosome Sci.* 4 : 21—30.
- Khatun J. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 489:57—74.
- Lamatsch D. K., Trifonov V., Schories S., Epplen J. T., Schmid M., Scharlt M. 2011. Isolation of a Cancer-associated microchromosome in the sperm-dependent parthenogen *Poecilia formosa*. *Cytogen. Gen. Res.* 135 : 135—142.
- Lamb J. C., Riddle N. C., Cheng Y. M., Theuri J., Birchler J. A. 2007. Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. *Chromosome Res.* 15 : 383—398.
- Liehr T., Mrasek K., Kosyakova N., Ogilvie C. M., Vermeesch J., Trifonov V., Rubtsov N. 2008. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans; are there B chromosomes hidden among them. *Mol. Cytogenet.* 1 : 12.
- López-León M. D., Neves N., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J. S., Hewitt G. M., Camacho J. P. M. 1994. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res.* 2 : 87—92.
- Martis M. M., Klemme S., Banaei-Moghaddam A. M., Blattner F. R., Macas J., Schmutzer T., Scholz U., Gundlach H., Wicker T., Simková H. 2012. Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 109 : 13 343—13 346.
- McQuade L. R., Hill R. J., Francis D. 1994. B-chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia: Pseudocheiridae). *Cytogen. Gen. Res.* 66 : 155—161.
- Metzker M. L. 2009. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Rev. Genet.* 11 : 31—46.
- Miao V. P., Covert S. F., VanEtten H. D. 1991a. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable («B») chromosome. *Science.* 254 : 1773—1776.
- Miao V. P. W., Matthews D. E., VanEtten H. D. 1991b. Identification and chromosomal locations of a family of cytochrome P-450 genes for pisatin detoxification in the fungus *Nectria haematococca*. *Mol. Gen. Genet.* 226 : 214—223.
- Nachman M. W. 1992. Geographic patterns of chromosomal variation in South American marsh rats, *Holochilus brasiliensis* and *H. vulpinus*. *Cytogen. Gen. Res.* 61 : 10—16.
- Patton J. L. 1972. A complex system of chromosomal variation in the pocket mouse, *Perognathus baileyi* Merriam. *Chromosome Res.* 36 : 241—255.
- Peppers J. A., Wiggins L. E., Baker R. J. 1997. Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res.* 5 : 475—479.
- Raman R., Sharma T. 1974. DNA replication, G- and C-bands and meiotic behaviour of supernumerary chromosomes of *Rattus rattus* (Linn.). *Chromosoma.* 45 : 111—119.
- Rubtsov N. B., Karamysheva T. V., Andreenkova O. V., Bochkarev M. N., Kartavtseva I. V., Roslik G. V., Borissoy Y. M. 2004. Comparative analysis of micro and macro B chromosomes in the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) performed by chromosome microdissection and FISH. *Cytogen. Gen. Res.* 106 : 289—294.
- Scalenghe F., Turco E., Edstrom J. E., Pirrotta V., Melli M. 1981. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma.* 82 : 205—216.
- Scharlt A., Hornung U., Nanda I., Wacker R., Muller-Hermlink H. K., Schlupp I., Parzefall J., Schmid M., Scharlt M. 1997. Susceptibility to the development of pigment cell tumors in a clone of the Amazon molly, *Poecilia formosa*, introduced through a microchromosome. *Cancer Res.* 57 : 2993—3000.
- Scharlt M., Nanda I., Schlupp I., Wilde B., Epplen J. T., Schmid M., Parzefall J. 1995. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature.* 373 : 68—71.
- Spits C., Le Caignec C., De Rycke M., Van Haute L., Van Steirteghem A., Liebaers I., Sermon K. 2006. Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nature Protocols.* 1 : 1965—1970.
- Stitou S., Diaz de La Guardia R., Jimenez R., Burgos, M. 2000. Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosomes of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for their origin and evolution. *Chromosome Res.* 8 : 305—311.
- Stubblefield E., Cram S., Deaven L. 1975. Flow microfluorometric analysis of isolated Chinese hamster chromosomes. *Exp. Cell Res.* 94 : 464.
- Szczerbal I., Switonski M. 2003. B chromosomes of the Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides* Gray) contain inactive NOR-like sequences. *Caryologia.* 56 : 213—216.
- Telenius H., Carter N. P., Bebb C. E., Ponder B. A. J., Tunnacliffe A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics.* 13 : 718—725.
- Teruel M., Cabrero J., Perfectti F., Camacho J. P. M. 2010. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma.* 119 : 217—225.
- Trifonov V. A., Perelman P. L., Kawada S. I., Iwasa M. A., Oda S. I., Graphodatsky A. S. 2002. Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora). *Chromosome Res.* 10 : 109—116.
- Vujosević M., Blagojević J. 2004. B chromosomes in populations of mammals. *Cytogen. Gen. Res.* 106 : 247—256.
- Ward O. G., Wurster-Hill D. H., Ratty F. J., Song Y. 1987. Comparative cytogenetics of Chinese and Japanese raccoon dogs, *Nyctereutes procyonoides*. *Cytogen. Gen. Res.* 45 : 177—186.
- Weimer J., Kiechle M., Senger G., Wiedemann U., Ovens-Raeder A., Schuierer S., Kautza M., Siebert R., Arnold N. 1999. An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. *Chromosome Res.* 7 : 355—362.
- Weise A., Timmermann B., Grabherr M., Werber M., Heyn P., Kosyakova N., Liehr T., Neitzel H., Konrat K., Bommer C. 2009. High-throughput sequencing of microdissected chromosomal regions. *Eur. J. Human Gen.* 18 : 457—462.
- Werren J. H. 1991. The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *American Naturalist.* 392—402.
- Wurster-Hill D. H., Ward O. G., Davis B. H., Park J. P., Moyzis R. K., Meyne J. 1988. Fragile sites, telomeric DNA sequences, B chromosomes, and DNA content in raccoon dogs, *Nyctereutes procyonoides*, with comparative notes on foxes, coyote, wolf, and raccoon. *Cytogen. Gen. Res.* 49 : 278—281.
- Yoshida K., Terai Y., Mizoiri S., Aibara M., Nishihara H., Watanabe M., Kuroiwa A., Hirai H., Hirai Y., Matsuda Y. 2011. B chromosomes have a functional effect on female sex determination in lake victoria cichlid fishes. *PLoS Genet.* 7 : e1002203.
- Yosida T. H., Wada M. Y. 1984. Cytogenetical studies on the Japanese raccoon dog. VI. Distribution of B-chromosomes in 1372 cells from 13 specimens, with special note on the frequency of the Robertsonian fission. *Proc. Japan Acad. Ser. B: Phys. Biol. Sci.* 60 : 301—305.
- Yudkin D. V., Trifonov V. A., Kukekova A. V., Vorobieva N. V., Rubtsova N. V., Yang F., Acland G. M., Ferguson-Smith M. A., Graphodatsky A. S. 2007. Mapping of KIT adjacent sequences on

canid autosomes and B chromosomes. Cytogen. Gen. Res. 116 : 100—103.

Ziegler C. G., Lamatsch D. K., Steinlein C., Enge W., Scharl M., Schmid M. 2003. The giant B chromosome of the cyprid

fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. Chromosome Res. 11 : 23—35.

Поступила 26 XI 2012

#### CONTEMPORARY APPROACHES TO B CHROMOSOME ANALYSIS

A. I. Makunin,<sup>1,2</sup> \* V. A. Trifonov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk,

<sup>2</sup> Theodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics of the St. Petersburg State University  
and <sup>3</sup> Novosibirsk State University;

\* e-mail: alex.makunin@gmail.com

The most recent data on sequencing and analysis of non-coding genome parts have revealed surprising biological functions of sequences, which were previously thought to be junk. Here we review the progress of techniques for B chromosome analysis — from methods of classical cytogenetics to contemporary technologies of high throughput genome sequencing, — and discuss the perspectives of involving new species with additional chromosome to ongoing genomic projects.

Key words: B chromosomes, whole-genome sequencing, genome analysis.

---