

were characterized by the readsorption of phage particles. The transmission of bacterial genes due to the generalized transduction links with the permutation of phage DNA. The obtained data are the importance prerequisite for molecular and genetical studying of pathogenesis processes in erwinias.

**САМАТАДЗЕ Т.Е.,<sup>1</sup> ЗЕЛЕНИНА Д.А.,<sup>3</sup> ШОСТАК Н.Г.,<sup>1</sup> ВОЛКОВ А.В.,<sup>3</sup>  
ПОПОВ К.В.,<sup>1</sup> РАЧИНСКАЯ О.А.,<sup>1</sup> БОРИСОВ А.Ю.,<sup>2</sup> ТИХОНОВИЧ И.А.,<sup>2</sup>  
ЗЕЛЕНИН А.В.,<sup>1</sup> МУРАВЕНКО О.В.<sup>1</sup>**

*1-Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН Россия, 119991,  
Москва, ул. Вавилова, 32, , e-mail: tsamatadze@gmail.com*

*2 – ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук, Санкт-  
Петербург, Пушкин-8 196608; e-mail: Alexey\_Borisov@arriam.spb.ru*

*3 - Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и  
океанографии, Москва 107140; e-mail: dzel67@mail.ru*

## **ХРОМОСОМНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНОМА ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.).**

Бобовые (FABACEAE) представлены 18000 видами растений включающие в себя как мелкие однолетние травянистые растения, так и крупные тропические деревья. Эти растения обладают уникальной способностью создавать симбиотические сообщества с некоторыми родами бактерий и микориз, образуя важнейшие азотфиксирующие системы в биосфере.

Среди бобовых подсемейство PAPILIONOIDEA содержит большое число сельскохозяйственных культур, одной из которой является горох посевной (*Pisum sativum* L.). Небольшой размер генома (1С=4,3 млрд.п.н.), семь пар хромосом (2n=14) среднего размера (4-6 мкм) делают его прекрасным объектом для цитогенетических исследований. Кроме того, горох является лучшим модельным объектом для изучения тройного симбиоза (бобовое растение+грибы арбускулярной микоризы+клубеньковые бактерии).

Несмотря на то, что в России и за рубежом создано большое количество сортов различного направления селекции (зерновые, кормовые, овощные), однако, как правило, все коммерческие сорта гороха обычно имеют недостаточно высокий симбиотический потенциал. Кроме того, сравнительного анализа геномов сортов и линий гороха различного направления селекции с помощью хромосомных и молекулярных маркеров до настоящего времени не проводилось, что и явилось целью данного исследования.

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования послужили семена четырех сортов зернового гороха: Frisson, Sparkle, Rondo, Капитал, двух овощных сортов: Finale и Виола, одного кормового сорта Роза Краун, двух генетических линий: SGE и Sprint-2, а также двух транслокационных линий: L-108 (T<sub>2-4s</sub>) и M-10 (T<sub>2-7s</sub>).

С-дифференциальное окрашивание, Ag-ЯОП-окрашивание, двуцветный FISH с зондами рТа 71, содержащими 45S рДНК, рТа 794, содержащими 5S рДНК, хромосомный и RAPD-PCR анализ проводили по описанным ранее методикам (Саматадзе и др., 2002; 2005; Зеленина и др., 2006; Muravenko et al., 2009).

### **Результаты и обсуждение**

Проведено изучение рисунков С-окраски хромосом в изучаемых сортах и линиях гороха. По морфологии и рисунку С-бэндинга были идентифицированы все

хромосомы. Сравнительное изучение рисунков С-окрашенных хромосом гороха в сортах и генетических линиях выявило полиморфизм гетерохроматических блоков, расположенных около ядрышкоорганизующих районов хромосом 4 и 7. Обнаружено, что размеры С-блоков в теломерных районах генетических линий и сортов на 1 и 2 хромосомах были одинаковыми, а на 3-7 хромосомах различались по размерам. У всех сортов зернового гороха крупный С-блок на хромосоме 4 локализован на спутнике, а среднего размера С-блок на хромосоме 7 – в районе, прилегающем к спутничной нити. В кариотипах генетических линий и у двух сортов овощного гороха Finale и Виола размеры этих С-блоков были практически одинаковы. В кариотипах изученных линий Sprint-2 и SGE более крупные теломерные С-бэнды выявлены на 3-7 хромосомах.

В связи с тем, что 1 и 2 хромосома кариотипа гороха по морфологии сходны для точной идентификации этих хромосом были изучены С-окрашенные хромосомы двух транслокационных линий L-108 (T<sub>2-4s</sub>) и M-10 (T<sub>2-7s</sub>). В результате С-окраски легко идентифицировался рисунок хромосомы 1, которая не участвовала в перестройке, что позволило представить полный кариотип С-окрашенных хромосом изучаемых сортов и линий гороха.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) пробой pTa71 позволила выявить в кариотипах всех сортов и двух генетических линий 45S рДНК в районах вторичных перетяжек хромосом 4 и 7. В кариотипах сортов гибридизационные сигналы с пробой pTa71 были интенсивнее на хромосоме 7, чем на хромосоме 4, а у линий они были одинаковыми. Минорных сайтов 45S рДНК не обнаружено. FISH с пробой pTa794 дала возможность локализовать 5S рДНК на 1, 3 и 5 хромосомах в кариотипах всех исследованных сортов и линий. Дополнительных сайтов локализации 5S рДНК не выявлено. В кариотипах изученных сортов интенсивность сигналов гибридизации пробы pTa794 была практически одинаковой. У генетических линий на хромосоме 5 интенсивность сигнала гибридизации pTa794 была значительно выше.

Исследование локализации 45S рДНК на спутничных хромосомах показало, что сигналы гибридизации на хромосоме 4 располагаются по длине спутничной нити и в спутнике, а на хромосоме 7 – в районе хромосомы, прилегающем к вторичной перетяжке и по длине спутничной нити. Таким образом, большая часть 45S рДНК входит в состав С-блоков, расположенных у вторичных перетяжек 4 и 7 хромосом, что может быть одной из причин полиморфности блоков приспутничного гетерохроматина. В изученных сортах зернового и овощного гороха сигнал гибридизации 45S рДНК был интенсивнее на хромосоме 7. У исследованных генетических линий интенсивности сигналов гибридизации рибосомных генов на обеих спутничных хромосомах были приблизительно одинаковы.

Изучение транскрипционной активности в кариотипах всех изученных форм с использованием Ag-ЯОР-окрашивания выявило наличие Ag-положительных районов в области вторичных перетяжек на спутничных хромосомах 4 и 7. На хромосоме 7 всегда наблюдался крупный блок серебра, как у линий, так и у сортов. В ядрах изученных образцов гороха при этом наблюдалось от одного до четырех Ag-окрашенных ядрышек.

По суммарной площади окрашенных серебром ядрышек изученные сорта гороха достоверно не различались, за исключением сорта Rondo. Не обнаружено корреляции между направлением селекции исследуемой формы и особенностями ее генома по хромосомно-молекулярным маркерам, однако существование такой корреляции исключить нельзя, поскольку исследуемая выборка очень мала, а для такого заключения требуется изучение геномов десятков сортов с известной историей происхождения.

Геномный полиморфизм четырех коммерческих сортов гороха с высоким симбиотическим потенциалом (трех сортов зернового гороха: Frisson, Sparkle, Rondo, одного гороха овощного сорта Finale), а также двух генетических линий: SGE и Sprint-2 был исследован с помощью RAPD-PCR с 4 информативными праймерами OPA06, OPA09 и OPA10 и OPA15 и последующего анализа RAPD-спектров в полиакриламидном геле. Метод позволил провести геномную идентификацию сортов и линий гороха. В то же время внутрисортовой и внутрелинейный полиморфизм в данном исследовании оказался крайне низким: при сравнении образцов в пределах кластеров полиморфные локусы были выявлены только в линии SGE и сорте Finale. Обнаружены, по крайней мере два сортоспецифичный фрагмента, по одному для сорта Rondo и линии Sprint 2, которые можно рассматривать как потенциальные маркеры для идентификации данных сортов.

Таким образом, геномы изученных сортов и линий различаются по хромосомному и геномному полиморфизму и имеют свои сортоспецифические особенности, что может явиться основой для дальнейшей детальной кариотипической и генотипической характеристики и создания паспорта генотипа такого важного модельного объекта цитогенетических исследований к которым принадлежит горох посевной.

#### **Выводы**

1. Выявлены различия рисунков С-окраски на спутничных хромосом в кариотипах сортов разного направления селекции.
2. Уточнена локализация сайтов гибридизации 5S и 45S рДНК, установлен межсортовой полиморфизм по размерам сайтов рибосомных генов на 4 и 7 хромосоме.
3. Статистический анализ суммарной площади интерфазных ядрышек, окрашенных серебром, не позволил выявить различий между изученными генотипами гороха.
4. С помощью RAPD-PCR анализа выявлен значительный межсортовой и низкий внутрисортовой геномный полиморфизм.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 07-04-13566-офи\_ц и Программой «Динамика генофондов растений, животных и человека».

#### **Литература**

1. Саматадзе Т.Е., Муравенко О.В., Зеленин А.В., Гостимский С.А. Идентификация хромосом генома гороха (*Pisum sativum* L.) по рисунку С-окраски. // Доклады Академии Наук. -2002.- т. 387. N 5.- С.714-717.
2. Саматадзе Т.Е., Муравенко О.В., Большева Н.Л., Амосова А.В., Гостимский С.А., Зеленин А.В. Изучение хромосом сортов и транслокационных линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с использованием FISH, Ag-ЯОР и DAPI-дифференциального окрашивания. // Генетика.-2005.- N 12.- С. 1665 – 1673.
3. Зеленина Д.А., Хрусталева А.М., Волков А.А. Сравнительное исследование популяционной структуры и определение популяционной принадлежности нерки (*Oncorhynchus nerka* ) Западной Камчатки с помощью RAPD-PCR и анализа полиморфизма микросателлитных локусов. // Генетика, 2006, т. 42, N 5, с. 693 – 704.
4. O.V. Muravenko, O. Yu. Yurkevich, N.L. Bolsheva, T.E. Samatadze, I. V. Nosova, D.A. Zelenina, A. A. Volkov, K. V. Popov, A.V. Zelenin. Comparison of genomes of eight species of sections *Linum* and *Adenolinum* from the genus *Linum* based on chromosome banding, molecular markers and RAPD analysis. *Genetika*, 2009, v.135, N 2, p. 245-255.

#### **Резюме**

С помощью С-/Ag-ЯОР-дифференциального окрашивания, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и RAPD-PCR анализа проведено изучение кариотипов 4 сортов и 2 линий гороха посевного. Показана перспективность использования

данных методов цитогенетического анализа для разработки методических подходов и принципов составления хромосомных паспортов.

C- and Ag-NOR-staining techniques, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and RAPD-PCR analysis were used to study karyotypes of four varieties and two lines of pea. It was shown that these comparative cytogenetic analysis methods were rather perspective for the development of methodical approaches and principles of making chromosome passports.

**ТИТОК М.А., ЧЕРНОВА А.И., ПУНТУС И.Ф., ВАСИЛЕНКО С.Л., ХАМЗА Ф.Д.**  
*Белорусский государственный университет,*  
*Беларусь, 220030, Минск, пр-т Независимости, 4, e-mail: [titok@bsu.by](mailto:titok@bsu.by)*

## **ОРГАНИЗАЦИЯ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ**

Ароматические углеводороды попадающие в природную среду обитания в результате аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, при сгорании различных видов топлива, выбросах коксо-, газо- и нефтехимических производств, а также содержащиеся в выхлопных газах автомобилей, представляют серьезную опасность для всех звеньев естественных биоценозов, приводя к их изменению или полной трансформации. По химической природе их можно разделить на моноароматические (бензол, толуол, ксилол и др.) и полиароматические (нафталин, антрацен, фенантрен, бифенилы, пирен, бенз(а)пирен, дибенз(а)пирен, перилен и др.). Следует отметить, что промежуточным продуктом окисления некоторых моно- и полициклических ароматических углеводородов (например, бензола, толуола, ксилола, нафталина, фенантрена) является катехол и его производные, вследствие чего полная деградация этих соединений может происходить с участием одних и тех же ферментных комплексов. Основная роль в утилизации ароматических углеводородов в природной среде обитания принадлежит микроорганизмам. Большим метаболическим потенциалом в отношении этих соединений обладают бактерии рода *Pseudomonas*, способные к их полной или частичной трансформации. Кроме того, представители этой таксономической группы характеризуются широким спектром метаболических реакций и способны утилизировать целый ряд органических субстратов. Изучение организации природных штаммов-деструкторов является основой, позволяющей целенаправленно создавать эффективные биологические средства очистки окружающей среды от органических соединений.

Целью настоящей работы явилось изучение физиологических свойств и структурно-функциональной организации систем биodeградации у природных нафталинутилизирующих бактерий.

### **Материалы и методы**

В работе использовали 102 штамма природных нафталинутилизирующих бактерий *Pseudomonas*, а также типовые штаммы *Pseudomonas* (Всесоюзная Коллекция Микроорганизмов и Вирусов, Москва, Россия) и типовые плазмиды группы IncP-9 и IncP-7 (коллекция кафедры генетики БГУ).

**Среды.** Бактерии выращивали в минимальной среде М9 [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. В качестве источника углерода и энергии использовали: глюкозу в концентрации 0,2 %, бромнафталин – 1 %. Нафталин, м-ксилол, о-ксилол, п-ксилол, керосин, дизельное топливо, бензиловый спирт, гексадекан наносили на крышку чашки Петри. Толуол и бензол вносили путем помещения на крышку чашки Петри запаянного с одного конца пластикового наконечника, содержащего 200 мкл одного из этих