

гены *mobB* и *mobD* полностью перекрываются с последовательностью гена *mobA*, в то время как ген *mobC* перекрывается геном *mobA* только частично (11 п.н.). Определены размеры генов мобилизации плазмиды рАН 36-4СРА: *mobA* рАН 36-4СРА составляет 1497 п.н., *mobB* - 489 п.н., *mobD* - 216 п.н., *mobC* – 324 п.н.

#### Литература

1. Cohan F.M. The role of genetic exchange in bacterial evolution // ASM News. - 1996.- vol. 62. - P. 631-636.
2. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids. Res. - 1979. - vol. 7. - P. 1513-1523.
3. Chan P.T, Ohmori H., Tomizawa J., Lebowitz J. Nucleotide sequence and gene organization of ColE1 DNA // The Journal of Biological Chemistry. - 1985. - vol. 260. - P.8925-8935.

#### Резюме

Новая плазида деградації ксенобіотиків, була виділена із штамма *Citrobacter hydrophila* IBRB-36-4СРА. Довжина плазмиди становить 5217 п.н. Реплікаційний регіон плазмиди рАН 36-4СРА гомологічний репліконам ColE1-типу і кодує послідовності РНКІ і РНКІІ. Плазида містить чотири гени мобілізації *mobCABD*. Послідовності генів *mobB* і *mobD* перекриваються геном *mobA*.

A new D-plasmid рАН 36-4СРА with a size of 5217 bp had been isolated from the *Citrobacter hydrophila* strain IBRB-36-4СРА. The origin of replication of рАН 36-4СРА homologous to ColE1-type plasmid. The replication region of the plasmid encodes a primer RNAI and countertranscript RNAII. The plasmid рАН 36-4СРА consists of four mobilization genes, *mobCABD*. The *mobB* and *mobD* genes entirely overlap with the *mobA* gene.

**ЗЛАЦЬКА А.В., КОРОЛЬ Л.В., ШИТІКОВА Ю.В., ШЕРЕПІТКО Д.В.**

Український інститут експертизи сортів рослин,

Україна, 03041 Київ, вул. Генерала Родимцева 15, e-mail: zlatska@hotmail.com

### ПЕРЕВІРКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ISSR-МАРКЕРІВ У ВИВЧЕННІ ГЕНОМУ БУРЯКА ЦУКРОВОГО

Цукровий буряк – є однією з найбільш поширених сільськогосподарських культур, основними напрямками використання якої є виробництво цукру та спирту, в зв'язку з чим, врожайність (врожай коренеплодів), якість (вміст сахарози і чистота соку) та стійкість до хвороб є основними господарсько цінними ознаками, на які в першу чергу звертає увагу селекціонер при створенні нових ліній та гібридів, оскільки саме вони формують економічний внесок у ефективність виробництва цукру та продуктів його переробки [1]. Сучасний рівень ефективною та інтенсивною селекції будь-якої сільськогосподарської культури не можливо уявити без залучення молекулярно-генетичних методів, а особливо молекулярно-генетичних маркерів, оскільки вони, на відміну від морфологічних ознак-маркерів, перекривають весь геном рослини, а їх прояв не залежить від впливу на рослину умов оточуючого середовища в процесі її росту та розвитку.

Проведений аналіз літературних джерел свідчить про відносно невелику кількість статей, присвячених питанню використання молекулярно-генетичних маркерів (як білкових, так і ДНК-маркерів) в аналізі геному буряка цукрового в порівнянні з іншими сільськогосподарськими культурами: ячмінь, пшениця, кукурудза, соя тощо. Усі ці напрямки зводилися до наступних:

а) маркування певних генів господарсько-цінних ознак: генів стійкості до нематод [2-3], генів формування коренеплодів [4], генів стійкості до різоманії тощо [5-6]; б) ідентифікація чужинного генетичного матеріалу в геномі ліній та гібридів буряка цукрового, що передано в його геном від споріднених диких видів *B. procumbens*, *B. webbiana*, *B. patellaris*, *B. nana* [3, 7]; в) побудова карт зчеплення [8-10]; г) встановлення філогенетичних зв'язків між дикими, культурними видами та видами бур'янів, що належать до роду *Beta* [11]; д) аналіз міжлінійного, внутрішньо лінійного та міжсортового поліморфізму буряка цукрового та дикоростучих співродичів цієї культури (RAPD методом [12]; AFLP [1, 13]; SSR-ПЛР [14-16]).

Крім того, цікавим виявився той факт, що в жодній з проаналізованих робіт щодо аналізу рослинного матеріалу буряка цукрового не використовували метод ISSR-ПЛР, що дозволяє аналізувати міжмікросателітні послідовності, оскільки праймери, що використовуються у цьому методі, складаються з тандемних коротких нуклеотидних повторів та одного (або більше) селективного нуклеотиду на 3'-кінці праймера. Мікросателітні послідовності оточують багато генів та можуть бути використані як лінкерні послідовності до них. ISSR-маркери не потребують попередньої інформації про послідовність, що планується ампліфікувати, мають високу точність і відтворюваність результатів та характеризуються домінантним типом успадкування. В зв'язку з цим, метою даної роботи було з'ясувати можливість використання методу ISSR-ПЛР для аналізу геному буряка цукрового.

#### Матеріали і методи

Матеріалом для аналізу слугували рослини гібридів (В<sub>II</sub> 360, В<sub>II</sub> 824, В<sub>II</sub> 302) з колекції Верхняцької ДСС, 20-30 з яких брали для проведення аналізу. Екстракцію ДНК проводили з проростків буряка цукрового за допомогою СТАВ методу [17]. ПЛР аналіз ISSR маркерів проводили по методиці ампліфікації SSR маркерів з температурою обпалення 50°C [18]. Розділення продуктів ампліфікації проводили у 2% агарозному гелі з наступною візуалізацією продуктів ампліфікації в ультрафіолетовому світлі з використанням бромистого етидію. Для проведення роботи було відібрано доволно 34 ISSR праймери (таблиця 1), що показали ефективність їх застосування при аналізі злакових культур [19].

#### Результати і обговорення.

Проведена робота складалася з двох основних етапів. На першому етапі досліджувалася можливість ідентифікації міжгібридного та внутрішньо гібридного молекулярно-генетичного поліморфізму у досліджених рослин за допомогою ISSR-ПЛР методу. На наступному етапі, в разі якщо такий поліморфізм було ідентифіковано, перевіряли стабільність прояву певних ампліконів, шляхом кількаретового повторення ампліфікації з цим же праймером та на цьому ж рослинному матеріалі.

Таблиця 1.

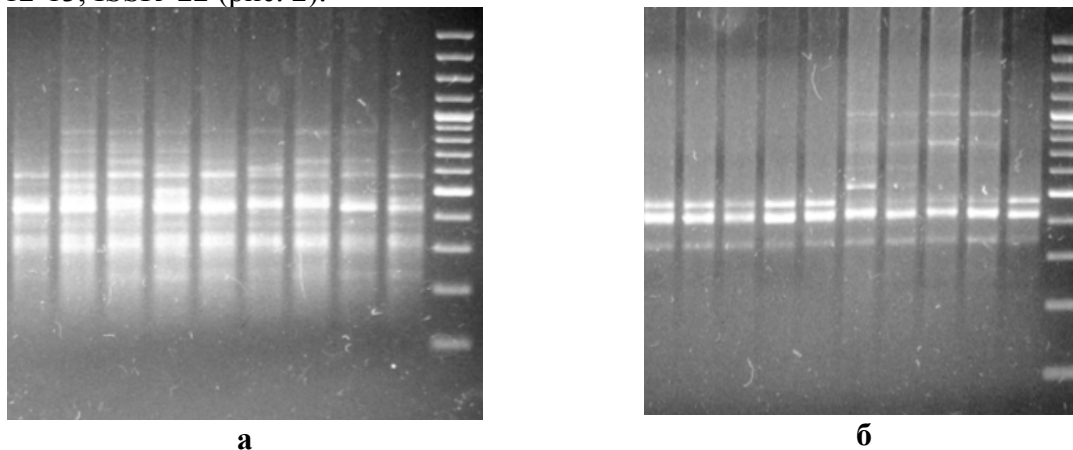
#### Перелік послідовностей ISSR праймерів, що було використано в дослідженні

назва	послідовність	назва	послідовність
ISSR 1	GA GA GA GA GA GA GA GA C	ISSR 18	GA GA GA GA GA GA GA T
ISSR 2	GGA GAG GAG AGG AGA	ISSR 19	AG AG AG AG AG AG AG G
ISSR 3	GAC AGA CAG ACA GAC A	ISSR 20	AG AG AG AG AG AG AG T
ISSR 4	GA GA GA GA GA GA GA	ISSR 21	AG AG AG AG AG AG AG CT
ISSR 5	TG TG TG TG TG TG TG G	ISSR 22	AG AG AG AG AG AG AG TA
ISSR 6	AC AC AC AC AC AC AC T	ISSR 23	G AG AG AG AG AG AG ATC
ISSR 7	TC TC TC TC TC TC TC G	ISSR 24	AG AG AG AG AG AG AG YC
ISSR 8	TC TC TC TC TC TC TC C	ISSR 25	CA CA CA CA CA CA CA RG
ISSR 9	AG AG AG AG AG AG AG C	ISSR 26	GT GT GT GT GT GT GT YA
ISSR 10	GGG TG GGG TG GGG TG	ISSR 27	AC AC AC AC AC AC AC YT
ISSR 11	GA GA GA GA GA GA GA CC	ISSR 28	AC AC AC AC AC AC AC YA
ISSR 12	AG AG AG AG AG AG AG TC	ISSR 29	CT CT CT CT CT CT CT G

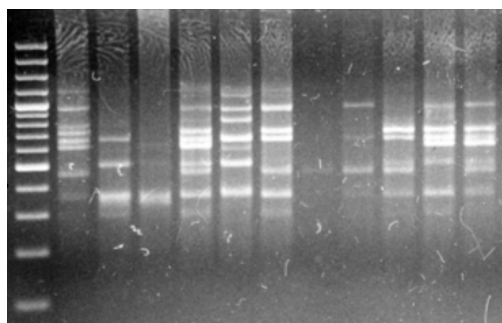
ISSR 13	TG TG TG TG TG TG TG TG A	ISSR 30	AGC AGC AGC AGC AGC AGC T
ISSR 14	AC AC AC AC AC AC AC AC G	ISSR 31	CTC CTC CTC CTC CTC CTC A
ISSR 15	AC AC AC AC AC AC AC AC C	ISSR 32	GAG GAG GAG GAG GAG GAG C
ISSR 16	GT GT GT GT GT GT GT GT C	ISSR 33	ACC ACC ACC ACC ACC ACC G
ISSR 17	GA GA GA GA GA GA GA GA C	ISSR 34	AGC AGC AGC AGC AGC AGC G

В результаті проведеної роботи було відібрано 19 праймерів, що характеризувалися стабільним проявом ампліконів, отриманих в наслідок ПЛП: ISSR 1-3, ISSR 5-6, ISSR 8-9, ISSR 11-15, ISSR 19-22, ISSR 25, ISSR 28, ISSR 31. В цей список потрапили 6 з 7 праймерів, що мали в своєму складі динуклеотидний повтор (AG)<sub>n</sub> ISSR 9, ISSR 12, ISSR 19-22, при чому ISSR 24, що не показав чітких стабільних ампліконів, мав в якості якірної послідовності модифікований нуклеотид, що може пояснити його неефективність при аналізі геному буряка цукрового. Ефективними виявилися 4 з 5 ISSR праймерів (ISSR 6, ISSR 14-15, ISSR 28) з динуклетидним повтором (AC)<sub>n</sub>, неефективність ISSR27 можна пояснити тими ж причинами, що і ISSR 24. Два праймери з (TG)<sub>n</sub> повторами ISSR 5 і ISSR 13 виявилися більш придатними для аналізу геному буряка цукрового, ніж два праймери з (GT)<sub>n</sub> повторами ISSR 16 і ISSR 26. З шести праймерів, що були носіями динуклетидного повтору (GA)<sub>n</sub> лише два праймери ISSR 1 і ISSR 11 виявилися ефективними, загальною їх характеристикою була наявність селективного нуклеотидів на 3'-кінці –C і –CC відповідно. Серед вивчених 8 праймерів з три- та тетрануклеотидними послідовностями лише 3 показали свою ефективність: ISSR 2 (GGA)<sub>n</sub>, ISSR 3 (GACA)<sub>n</sub> та ISSR 31 (TCC)<sub>n</sub>.

Серед проаналізованих маркерів були високополіморфні (на приклад ISSR 14-15 та ISSR 19), що давали можливість виявити в електрофоретичному спектрі продуктів ампліфікації більш ніж 20 ампліконів (рис. 1), низькополіморфні (ISSR 5-6, ISSR 8-9), що мали 6 ампліконів і менше (рис. 1), а також маркери з середнім рівнем поліморфізму ISSR 12-13, ISSR 22 (рис. 2).



**Рис. 1.** Приклад високополіморфного (а, ISSR 19) та низькополіморфного (б, ISSR 5) спектру продуктів ампліфікації



**Рис. 2.** Приклад ISSR праймеру з середнім рівнем поліморфізму (ISSR 13)

В цілому проведена робота показала придатність використання методу ISSR-ПЛП для аналізу геному буряка цукрового, але цьому аналізу має передувати велика попередня робота з підбору відповідних праймерів, оскільки в нашому дослідженні лише 56% проаналізованих праймерів виявилися придатними для подальшого використання в молекулярно-генетичному аналізі геному буряка цукрового з метою

паспортизації гібридів та ліній цієї культури, маркування та ідентифікації певних генів тощо. Найбільш ефективними виявилися праймери з динуклеотидними повторами (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> та (TG)<sub>n</sub>, меншу ступінь ефективності мали праймери з три та тетрануклеотидними повторами.

### Література

1. De Riek J., Calsyn E., Everaert I., Van Bockstaele E. AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties // *Theor. and Appl. Genet.* – 2001. – vol. 103. – P.1254-1265.
2. Jung C., Wehling P., Loptien H. Electrophoretic investigation on Nematode Resistant Sugar beet // *Plant Breeding* – 1986. – 97, Issue 1. – P. 39-45.
3. Jung C., Wricke G. Selection of Diploid Nematode-Resistant Sugar Beet from Monosomic Addition lines // *Plant Breeding* – 1987. – 98, Issue 3. – P. 205-214.
4. Abe J., Guan G.-P., Shimamoto Y. A marker-assisted analysis of bolting tendency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.)//*Euphytica* – 1997. – 94, №2. – P. 137-144.
5. Gidner S., Lennefors B.-L., Nilsson N.-O., Bensefelt J., Johansson E., Gyllenspetz U., Kraft T. QTL mapping of BNYYV resistance from the WB41 source in sugar beet // *Genome.* – 2005. – 48. – P. 279-285.
6. Grimmer M.K., Trybush S., Hanley S., Francis S.A., Karp A., Asher J.C. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* // *Theor. and Appl. Genet.*- 2007.- vol. 114, № 7.- P.1151-1160.
7. Jung C., Herrmann R.G. A DNA probe for rapid screening of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) carrying extra chromosomes from wild beet of the *Procumbentes* section // *Plant Breeding* – 1991. – 107, Issue 4. – P. 275-279.
8. Uphoff, H., Wricke G. A genetic map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) based on RAPD markers// *Plant Breeding* - 1995. - V. 114. - P. 355-357.
9. Pillen K., Steinrucken G., Wricke G., Herrmann R. G., Jung C. A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Theor. and Appl. Genet.* – 1992 - V. 84., № 1-2. - P. 129-135.
10. Pillen K., Steinrucken G., Herrmann R. G., Jung C. An extended linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including nine putative lethal genes and the restorer gene X // *Plant Breeding.* – 1993 - V. 111.- P. 265-272.
11. Bartsch D., Ellstrand N.C. Genetic evidence for the origin of Californian wild beets (genus *Beta*) // *Theor. and Applied Genet.* – 1999. – 99, № 7-8. – P. 1120-1130.
12. McGrath J.M., Derrico C.A., Yu Y. Genetic diversity in selected, historical US sugar beet germplasm and *Beta vulgaris* ssp. *maritime* // *Theor. and Appl. Genet.* - 1999. - vol 98, № 6-7. - P. 968-976.
13. Hansen M., Kraft T., Christiansson M., Nilsson N.-O. Evaluation of AFLP in *Beta* // *Theor. and Appl. Genet.* - 1999. - vol 98., № 6-7. - P. 845-852.
14. Morchen, M., J. Cuguen, G. Michaelis, C. Hanni, P. Saumitou-Laprade Abundance and length polymorphisms of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L.// *Theor. and Appl. Genet.* - 1996. - V. 92.- P. 326-333.
15. Desplanque B., Boudry P., Broomberg K., Saumitou-Laprade P., Cuguen J., Van Dijk H. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weed forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers // *Theor. and Appl. Genet.* – 1999 – V. 98.,№ 8 – P. 1194-1201.
16. Dornate J. Entwicklung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.). / Dissertation Universität. Gatersleben, 2001. 125 p.
17. Kleinhofs A., Kilian A., Maroof M.A.S. et al. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome // *Theor. and Appl. Genet.* – 1993. – vol. 86. – P. 705-712.
18. Roder M.S., Korzun V., Wendehake K. et al. A microsatellite map of wheat // *Genetics.* – 1998. – 149. – P. 2007-2023.

19. Ma Z. Q., M. Roder, M. E. Sorrells. Frequencies and sequence characteristics di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat // Genome.- 1996. - vol. 39. - P. 123-130.

### **Резюме**

Проведенная работа показала эффективность использования метода ISSR-ПЦР для анализа генома сахарной свеклы. Из 34 использованных ISSR праймеров к ди-, три- и тетра-нуклеотидным повторам 19 оказались пригодными к дальнейшему использованию в молекулярно-генетической работе. Наиболее эффективными оказались праймеры с динуклеотидными повторами (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> и (TG)<sub>n</sub>.

Проведена робота показала ефективність застосування методу ISSR-ПЛР для аналізу геному буряка цукрового. З 34 використаних ISSR праймерів до ди-, три- та тетра-нуклеотидних повторів 19 виявилися придатними для подальшого використання в молекулярно-генетичній роботі. Найбільш ефективними виявилися праймери з динуклеотидними повторами (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> та (TG)<sub>n</sub>.

Present work showed the efficiency of ISSR-PCR method for analysis of sugar beet genome. Among 34 ISSR to di-, tri-, and tetra-nucleotide repeats, applied in present work 19 appeared to be suitable for further molecular genetic investigation. The most effective primers were primers with di- nucleotide repeats (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> та (TG)<sub>n</sub>.

**ИВАНОВА Э.А., ВАФИНА Г.Х., ТРОПЫНИНА Т.С., ИВАНОВ Р.С.**

*Институт биологии Уфимского научного центра Российской Академии Наук, Россия, 450053, Уфа, пр. Октября 69, e-mail: evilina@anrb.ru*

### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ АРГ-Х ПРОТЕОЛИЗА В ПРОТЕОМЕ ГЕНОМА ПРО- И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

Старая догма молекулярной биологии, согласно которой то, что справедливо для кишечной палочки, справедливо и для слона (афоризм Ж. Моно) сейчас подвергается пересмотру [1]. В 1990г вышла статья Гюнтер Альбрехт-Бюлера (Gunter Albrecht-Buehler) [см 2] о том, что цитоплазма клетки высоко структурирована, разделена мембранами и вся пронизана нитями цитоскелета, с этой точки зрения внутриклеточные реакции более адекватно может описывать только надмолекулярная химия иммобилизованных ферментов, где уже интегрированы взаимодействия многих макромолекул. Как известно основой жизни являются линейные гетерополимеры – нуклеиновые кислоты и белки. Многократное сокращение линейных размеров ДНК происходит таким образом, что общая протяженность 2м геномной ДНК средней эукариотической клетки упаковывается в ядре, диаметр которого составляет 8-10мкм, при сохранении доступности определенных участков ДНК для регуляторных факторов и ферментов транскрипции [3]. Что касается бактериальной клетки, то её геном упаковывается в диапазоне 1,1-1,5×2,5-6,0мкм [4]. По мнению С.В. Разина [3] крупномасштабная пространственная организация ДНК в геноме эукариотической клетки играет важную роль в работе эпигенетических механизмов, является достаточно сложной, далеко не случайной и происходит в несколько этапов: накручивание ДНК на нуклеосомы; компактизация нуклеосомной нити с образованием так называемой 30 нм фибриллы; сворачивание 30 нм фибриллы в гигантские петли закрепленные на белковой скелетной структуре ядра – ядерном матриксе. Вся изложенная схема упаковки ДНК в клеточном ядре, как показали экспериментальные данные, не может быть единообразной [5]. Каковы уровни упаковки бактериальной ДНК нам пока мало что известно. В связи с этим