

Xgwm 3	84,82,80
Xgwm 18	190,186, 182
Xgwm 165	194,192
Xgwm 261	214, 192,174
Xgwm 325	150, 146, 141, 137
Xgwm 437	126, 118, 112, 106, 98
Xgwm 357	127,125,121,119
Xgwm 095	122,120,118
Xgwm 155	149,147,143,141
Xgwm 186	123,121,119

Кластерний аналіз за методом Нея [5] надав нам можливість диференціювати сорти озимої пшениці за ступенем генетичної спорідненості, що співпадає з родоводом цих сортів.

Література

1. *Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А.* Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. - 2002. - 38.- №9. - С.1173-1195.
2. *Конарев А.В.* Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // Аграрная Россия. – 2006. - №6.- С.4-23.
3. *Сиволап Ю.М.* Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. Научно-методическое руководство. Киев. Аграрная наука. 1998. – 156с.
4. *Roder M.S., Korzun B.S. et al.* The physical mapping of microsatellite markers in wheat // Genome. – 1998. – Vol. 41. – P. 278-283.
5. *McIntosh R., Hart G.* Catalogue of gene symbols for wheat // Proc. 9th Intern. Wheat Genetics Symp. – 1998, Saskaton, Canada, vol.5 – P.123-145.

Резюме

Проведено вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму нових сортів озимої м'якої пшениці селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та інших селекційних установ за допомогою мікросателітного аналізу. Електрофоретичні спектри фрагментів SSR-маркерів є унікальні для сортової ідентифікації пшениці.

Проведено изучение молекулярно-генетического полиморфизма новых сортов озимой мягкой пшеницы селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины и других селекционных центров с применением микросателлитного анализа. Электрофоретические спектры фрагментов SSR-маркеров являются уникальными для сортовой идентификации пшеницы

Using the microsatellite analysis the genetics polymorphism in new varieties of winter soft wheat in Institute of physiology of plants and genetics, National Academy Sciences of Ukraine has been studied. Patters SSR-amplicons give the characteristic of a level that allow to high-quality identification wheat.

СЕРГЕЕВА Ж. Ю.¹, ГОРЬ Т. Е.², БУРОВА Л. М.³, ТОВКАЧ Ф. И.²

¹*Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,*

Украина, 65029, Одесса, ул. Дворянская, 2, e-mail: sergeevazh@gmail.com

²Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 154

³Львовский национальный медицинский университет,
Украина, 79014, Львов, ул. Пекарская, 69

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРИПТИЧЕСКИХ ПЛАЗМИД *ERWINIA CAROTOVORA*

Одним из наиболее интересных и мало изученных на сегодняшний день явлений, характерных для фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora*, является наличие значительного числа внехромосомных генетических элементов. Большинство из них относится к разряду криптических из-за отсутствия данных относительно их функций и значения в экологии и физиологии ервиний. Поэтому приоритетной задачей является поиск подходов к исследованию эндогенных плазмид *E. carotovora*.

Представленная работа была направлена на поиск приемлемого метода транспозонного мутагенеза эндогенных плазмид с целью установления их роли в экологии важной фитопатогенной бактерии *E. carotovora*.

Материалы и методы.

В работе использовали фитопатогены *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc): 48A (pCA25) и 48A Cm^R – 7/4b (pCA25::Tn9), устойчивый к 100 мкг/мл хлорамфеникола. Методы выделения плазмидных ДНК, их рестрикционный анализ, а также схема внесения транспозона Tn9 в плазмиду pCA25 представлены в предыдущих сообщениях [1, 2].

Результаты и их обсуждение.

Плазмида pCA25 является хорошо изученным генетическим элементом бактерии *E. carotovora* штамма 48A. Ранее нами было показано, что при взаимодействии с клетками данного штамма с бактериофага P1 *Escherichia coli* осуществляется специализированная трансдукция маркера устойчивости к хлорамфениколу в клетки ервиний с одновременным внесением транспозона Tn9 в плазмиду pCA25 [3]. Нами было получено несколько вариантов плазмиды pCA25::Tn9 (рис. 1). Благодаря использованию большого числа транспозон-меченных клонов мы выявили высокую стабильность плазмиды как в клетках *E. carotovora*, так и в клетках лабораторных штаммов-трансформантов *E. coli* DH1. Излечения клеток от плазмиды не происходило ни в результате обработки SDS, ни с помощью температурных воздействий или обработки этидий бромидом. Также было показано, что транспозон встраивается только в определенный локус на плазмиде pCA25. Аналогичным образом транспозон Tn9 ведёт себя и при встраивании в геном фага λ, у которого обнаружено 3 сайта транспозиции в несущественных областях генома. До сих пор не было выявлено никаких фенотипических признаков, кодируемых плазмидой pCA25. По нашему мнению необычная стабильность наследования плазмиды pCA25 и размер, близкий к таковому кольцевого профага P4 *E. coli* [4], свидетельствует о профаговом происхождении данного генетического элемента *E. carotovora*.

В рамках этого исследования мы расширили набор обнаруженных плазмид *E. carotovora* с целью возможного выявления элементов аналогичных по размеру и природе профаговому элементу pCA25. Изучение 54 штаммов различного происхождения показало, что половина плазмидосодержащих штаммов несет внехромосомные ДНК аналогичные по размеру и сайтам рестрикции для эндонуклеаз *HpaI* и *EcoRV* плазмиде pCA25 (9,8 т.п.н.). Большинство штаммов, несущих внехромосомную ДНК размером 9,8 т.п.н., принадлежат к одной экологической нише (штаммы из российских коллекций). Рестрикционный анализ позволил выявить природные варианты плазмиды, содержащие делеции либо вставки в В-фрагменте *EcoRV*, в который также происходит встраивание транспозона Tn9. Это служит

дополнительным подтверждением наличия на внехромосомной ДНК несущественной области, характерной для профаговых элементов.

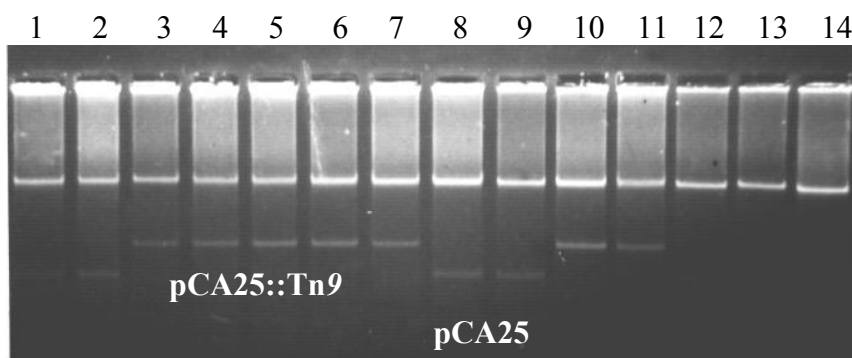


Рис. 1. Скрининг клонов *E. carotovora subsp. carotovora* 48A Cm^r с плазмидой pCA25::Tn9.

Кроме того, нами было проведено изучение взаимодействия плазмиды pCA25 с бактериофагом P1. Определённый характер этого взаимодействия отражается на адсорбции фага P1 на клетках *E. carotovora*. Фаг P1 нормально адсорбируется на клетках штамма 48А с плазмидой pCA25. Скорость адсорбции увеличивается по мере снижения множественности инфекции. Однако эффективность прикрепления фага P1 к поверхности клеток, которые несут плазмиду pCA25::Tn9 или её делеционный вариант pCA25::ΔTn9, снижается примерно в 2-2,5 раза (рис. 2). В других независимых исследованиях было показано, что, по сравнению со штаммом 48А, фаг P1 значительно менее эффективно адсорбируется на клетках других, восприимчивых к нему, штаммах ервиний. На основе этих данных мы сделали предположение, что плазида pCA25 несет гены, продукты которых влияют на адсорбцию. При этом транспозиция Tn9 частично нарушает экспрессию этих генов в составе транспозонных вариантов, вследствие изменения вторичной и третичной структуры плазмидной ДНК.

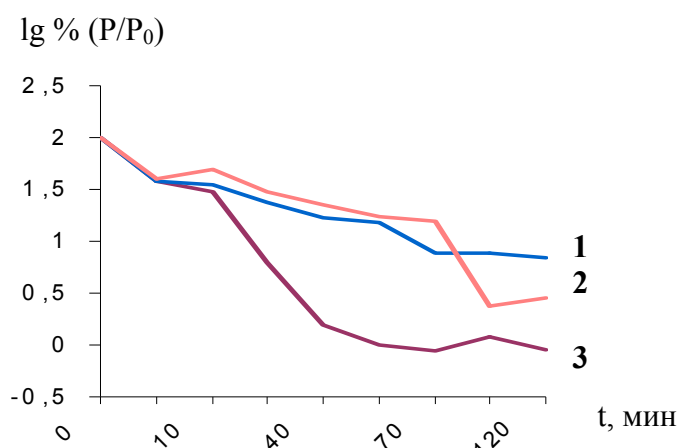


Рис. 2. Адсорбция фага P1 на клетках *E. carotovora* 48А (pCA25) при множественности инфекции 1,0 фаг на клетку: 1 – *Ecc* 48А-7/4b -18 (pCA25::ΔTn9); 2 - *Ecc* 48А-7/4b (pCA25::Tn9); 3 - *Ecc* 48А(pCA25)

Дальнейшая перспектива исследований предполагает определение размера несущественной области ДНК плазмиды pCA25 и поиск в её составе участка, гомологичного IS1 элементу. Встраивание транспозона Tn9 в плазмиду pCA25 может

происходит за счет рекомбинации между гомологичными участками IS1 последовательности. Для проверки этого предположения мы планируем использовать транспозон *miniTn10* из суицидной плазмиды pLOF *E. coli*, который часто используется как инструмент транспозонного мутагенеза плазмидных и хромосомальных ДНК и несёт маркер устойчивости к канамицину. Он не содержит участков, гомологичных IS1 элементу. Нами уже получены несколько вариантов плазмиды pCA25::*miniTn10* (рис. 3). Планируется провести рестрикционный анализ плазмидной ДНК с целью установления места встраивания транспозона *miniTn10*.

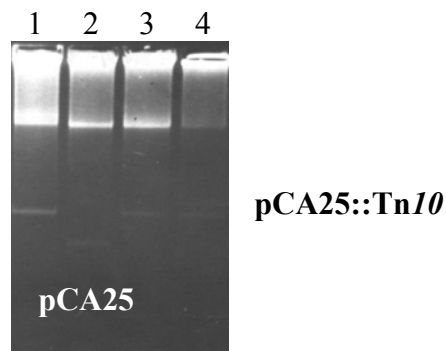


Рис. 3. Скрининг клонов *E. carotovora subsp. carotovora* 48A Km^r с плазмидой pCA25::*miniTn10*.

Таким образом, транспозонный мутагенез криптических плазмид является очень удобным методом для установления их молекулярно-генетической организации и, в последствии, выяснения роли внехромосомных ДНК в экологии важной фитопатогенной бактерии *E. carotovora*.

Литература

1. Товкач Ф. И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2001. – Т.70, № 6. – С. 804-810.
2. Бурова Л. М., Товкач Ф. И. Экспрессия генов профага P1 *Escherichia coli* в клетках фитопатогенных эрвиний // Микробиол. журн. – 2006. – Т. 68, № 2. – С. 39-47.
3. Сергеева Ж. Ю., Бурова Л. М., Товкач Ф. И. Внесение транспозона Tn9 в эндогенные плазмиды *Erwinia carotovora* при лизогенизации клеток колифагом P1 // Микробиол. журн. – 2006. – Т. 68, № 4. – С. 34 – 39.
4. Бурова Л. М., Горб Т. Е., Товкач Ф. И. Природа криптической плазмиды pCA25 *Erwinia carotovora subsp. carotovora* 48A // Микробиол. журн. – 2007. – Т. 69, № 2. – С. 23 – 28.

Резюме

На основе транспозонного мутагенеза разработан подход для изучения молекулярно-генетической организации криптических плазмид важной фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* и выяснения их роли в её экологии.

На основі транспозонного мутагенезу розроблено підхід для вивчення молекулярно-генетичної організації криптичних плазмід важливої фітопатогенної бактерії *Erwinia carotovora* та з'ясування їх ролі в її екології.

A new approach based on transposon mutagenesis was created for study of molecular-genetical organization of cryptic plasmids of important phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* and identification of their role in its ecology.