

УДК 575.114.4

КАРТИРОВАНИЕ ПЛАЗМИДЫ R906, ХАРАКТЕРИЗУЮЩЕЙСЯ ШИРОКИМ СПЕКТРОМ ХОЗЯЕВ

Н. Г. АЗАРЯН, В. А. САКАНЯН

Построены рестрикционные карты плазмиды R906 для ферментов EcoRI, BamHI, HindIII. Сайты расщепления этих ферментов сгруппированы в двух районах генома R906. На векторах pTK16 и pBR322 отклонированы EcoRI- и HindIII-фрагменты ДНК R906, содержащие гены *str* и *suI*. Другие районы ДНК R906 не клонируются на этих векторах. С помощью блоттинг-гибридизации на карте R906 обнаружены два протяженных района гомологии, специфичной для Inc P-1 плазмид. Данные строго указывают на одинаковый принцип молекулярной организации плазмид с широким спектром хозяев.

Ключевые слова: плазида R906, рестрикционная и генетическая карта, делеция, гомология, ДНК.

Плазмиды P-1 группы несовместимости (Inc P-1) передаются путем конъюгации во многие грам-отрицательные бактерии [2, 12]. Они мобилизуют также перенос ДНК хозяина, что позволяет использовать их для генетического картирования различных микроорганизмов [7]. В ряде работ показано, что плазмиды с широким спектром хозяев в функциональном и структурном отношении аналогичны [1, 11, 16]. Очевидно, детальное изучение биологии Inc P-1 плазмид способствовало бы пониманию механизмов, ответственных за свойство космополитизма, и конструированию на их основе усовершенствованных векторов для молекулярного клонирования ДНК.

Нами проведено физическое и генетическое картирование ДНК Inc P-1 плазмиды R906. С помощью гибридационного анализа на карте плазмиды R906 локализованы районы гомологии, специфичные для Inc P-1 плазмид.

Материал и методика. Для клонирования фрагментов ДНК R906 ($Ap^r Sm^r Su^r$) использовали векторы pTK ($Tc^r Km^r$) и pBR322 ($Ap^r Tc^r$). Перенос рестрицированной ДНК R906 на интроцеллюлозные фильтры (BA85, Schleicher, Schull) проводили по описанным методам [14, 15]. Nick — трансляцию ДНК плазмид R751 (Tp^r) и RP4 ($Ap^r Tc^r Km^r$) осуществляли согласно описанному в литературе методу [9]. Условия рестрикции, лигирования, электрофореза и гибридализации ДНК описаны ранее [1].

Результаты и обсуждение. EcoRI-фрагменты ДНК R906 клонировали по единичному EcoRI сайту вектора pTK16. HindIII-фрагменты ДНК R906 клонировали по соответствующему сайту вектора pBR322. Селекцию рекомбинантных плазмид в реципиенте *E. coli* K12 C600 вели по одному из признаков устойчивости плазмиды R906. Было отобрано несколько десятков клонов, которые по приобретенным признакам распределились всего на три группы. По одному представителю

каждой группы очищали на селективной среде и из них выделяли плазмидную ДНК. Электрофоретический анализ рестрицированных плазмидных ДНК показал, что они приобрели *EcoRI*-фрагменты с мол. весами 11,0 ко и 5,8 ко (рекомбинантные плазмиды соответственно обозначены pNA2 и pNA3) и *HindIII*-фрагмент с мол. весом 9,7 ко (плазмиды pNA8). На клонированных фрагментах ДНК Р906 были определены сайты расщепления для ферментов *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* (рис. 1).

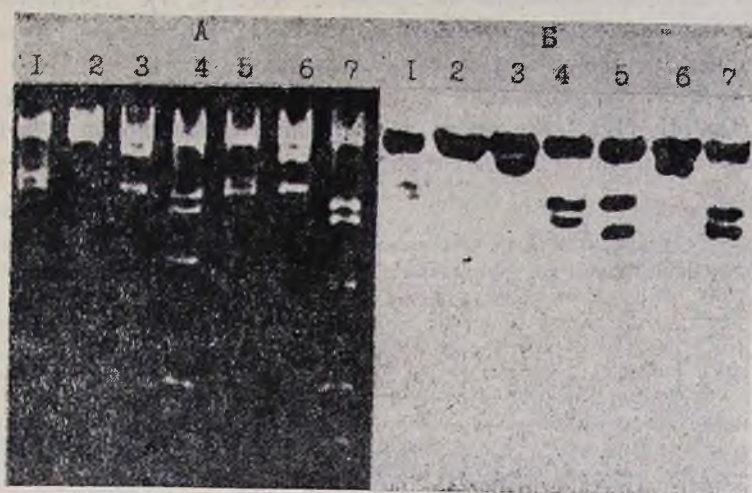


Рис. 1. Электрофореграмма (А) и автораднограмма (Б) рестриционных фрагментов плазмиды R906, гибридизующихся с ³²P-ДНК RP4.

1 — *EcoRI*; 2 — *BamHI*; 3 — *HindIII*; 4 — *EcoRI/BamHI*; 5 — *EcoRI/HindIII*; 6 — *BamHI/HindIII*; 7 — *EcoRI/BamHI/HindIII*.

Плазмиды pNA3 и pNA8 придают клеткам устойчивость к стрептомицину. Это указывает на то, что в клонированных фрагментах ДНК Р906 локализован ген(ы) *str*. В клонированных фрагментах плазмид pNA3 и pNA8 присутствует один и тот же *EcoRI/HindIII*-субфрагмент с мол. весом 4,7 ко. Следовательно, ген(ы) *str* плазмиды Р906 локализуется на этом субфрагменте ДНК. Плазмида pNA2 придает клеткам устойчивость к сульфадимезину. Следовательно, ген(ы) *suI* локализуется на клонированном фрагменте этой плазмиды.

В независимых трех экспериментах мы пытались клонировать гены плазмиды Р906, ответственные за ее репликацию. Для этого лигированной смесью рестрицированных ферментов *EcoRI* или *HindIII* ДНК Р906 и рТК16 или рВР322 трансформировали штамм *E. coli* KS55polA_{ts}. Известно, что репликация *ColEI*-подобных репликонов зависит от ДНК-полимеразы I [8]. В то же время плазмида Р906 стабильно реплицируется в штамме, дефектном по ДНК-полимеразе I. Поэтому можно ожидать, что гер гены плазмиды Р906 обеспечат репликацию *ColEI*-компонента в составе гибридных молекул. Однако при выращивании трансформированных клеток *E. coli* KS55 при 42° на питательном агаре с канамицином или тетрациклином не было обнаружено

антибиотикустойчивых колоний. Отпечатавшиеся на среды с канамицином или тетрациклином Km^r и Tc^r трансформанты, отобранные при 30°, также не размножались при их последующей инкубации при 42°. Эти данные позволяют предположить, что гер гены плазмиды R906 не сгруппированы в одном районе ДНК. Такая картина организации жизненно важных генов показана для других Inc P-1 плазмид R751 и RP4 [11, 13, 17]. Не исключена также возможность того, что определенные фрагменты плазмиды R906 не клонируются из-за присутствия на них генов *kil*, кодирующих продукты, летальные для клетки-хозяина. Такие гены идентифицированы на плазмиде RK2 [4, 5]. Летальное действие их контролируется генами *koq*, которые обнаружены у всех исследованных Inc P-1 плазмид, включая и плазмиду R906 [5].

ДНК R906 обрабатывали комбинацией двух или трех ферментов EcoRI, BamHI, HindIII и продукты перевара анализировали в 1%-ном агарозном геле (табл. 1). Дополнительно проводили также рестрикции-

Таблица

Размеры фрагментов ДНК плазмиды R906 (в килобазах), образующиеся при расщеплении рестриктазами EcoRI, BamHI, HindIII в отдельности и в различных комбинациях

	EcoRI	BamHI	HindIII	EcoRI BamHI	EcoRI HindIII	BamHI HindIII	EcoRI BamHI HindIII
A	<u>24,6</u>	<u>27,2</u>	<u>26,3</u>	<u>23,2</u>	<u>24,6</u>	<u>24,0</u>	<u>23,2</u>
B	<u>11,0</u>	<u>24,0</u>	<u>17,5</u>	<u>9,6</u>	<u>10,1</u>	<u>16,2</u>	<u>8,8</u>
C	<u>9,6</u>	<u>3,7</u>	<u>9,7</u>	<u>8,8</u>	<u>7,4</u>	<u>9,7</u>	<u>7,4</u>
D	<u>5,8</u>		<u>1,2</u>	<u>5,8</u>	<u>4,7</u>	<u>2,3</u>	<u>4,7</u>
E	<u>2,8</u>			<u>2,8</u>	<u>2,8</u>	<u>1,4</u>	<u>2,8</u>
F	<u>1,0</u>			<u>2,3</u>	<u>2,2</u>	<u>1,2</u>	<u>2,2</u>
G				<u>1,5</u>	<u>1,1</u>	<u>0,1</u>	<u>1,5</u>
H				<u>0,8</u>	<u>0,9</u>		<u>1,4</u>
I				<u>0,2</u>	<u>0,85</u>		<u>1,1</u>
J					<u>0,1</u>		<u>0,85</u>
K							<u>0,8</u>
L							<u>0,1</u>
M							<u>0,1</u>

Одной линией подчеркнуты фрагменты, гибридизующиеся с ³²P-мечеными ДНК RP4 и R751, двумя линиями — только с ³²P-ДНК R751.

онный анализ делеционных мутантов, полученных ранее [1]. В результате была построена физическая карта плазмиды R906 и ее делеционных производных (рис. 1). Как и у Inc P-1 плазмид R751 [11] и RP4 (или RK2 и RP1) [3, 6, 10], сайты рестрикции в геноме R906 сгруппированы по крайней мере в двух участках. Обращает на себя внимание то, что в районе с координатами 0—23,2 не имеется сайтов расщепления для использованных рестриктаз.

Для оценки структурной аналогии Inc P-1 плазмид было проведено также сравнение нуклеотидных последовательностей геномов R906,

RP4 и R751. С этой целью ^{32}P -меченную ДНК RP4 и R751 гибридизовали с рестрикционными фрагментами ДНК R906, фиксированными на нитроцеллюлозных фильтрах. На рис. 2 (см. также табл.) видно,

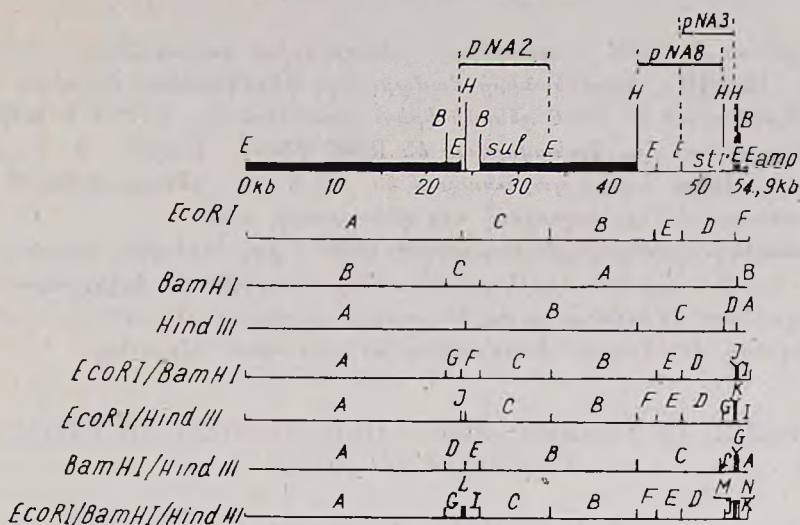


Рис. 2. Физическая и генетическая карта плазмиды R906 с локализацией на ней районов гомологии, специфичных для Inc P-1 плазмид (отмечены жирной линией). Сокращения на карте обозначают: E, B, H—сайты расщепления для рестриктаз EcoRI, BamHI, HindIII соответственно. Под картой даны размеры и обозначения рестрикционных фрагментов (см. табл.).

что многие районы ДНК R906 интенсивно гибридизуются с использованными пробами. Гетеродуплексный анализ ДНК плазмид R906 и R751 подтверждает эти данные и свидетельствует о протяженном характере районов гомологии (данные не приведены).

На карте плазмиды R906 районы гомологии, специфичные для Inc P-1 плазмид, охватывают по крайней мере два больших района с координатами 0—23,2 ко и 26,9—43,1 ко.

Как описано в предыдущей работе, у плазмиды R906 можно получать только относительно небольшие делеции, которые не затрагивают района ДНК с координатами 0—24,6 ко и 35,7—43,1 ко. Полученные данные показывают, что в этих двух физически разобщенных районах генома R906 расположены жизненно важные гены плазмиды и гены, влияющие на жизнеспособность клетки-хозяина. Сравнение результатов, полученных для Inc P-1 плазмид R906, RP4 и R751, позволяет заключить, что для плазмид с широким спектром хозяев характерен одинаковый принцип структурной и функциональной организации.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР,
Научно-исследовательский, технологический
институт аминокислот

Поступило 26.IX 1982 г.

ՏՆՐԵՐԻ ԼԱՅՆ ՍՊԵԿՏՐՈՎ ԲՆՈՐՈՇՎՈՂ R906 ՊԼԱՉՄԻԴԻ ՔԱՐՏԵԶԱԳՐՈՒՄԸ

Ն. Հ. ԱՋԱՐՅԱՆ, Վ. Ա. ՍԱԿԱՆՅԱՆ

Կազմված են R906 պլազմիդի ռեստրիկցիոն քարտեզները *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* ֆերմենտների համար: Այդ ֆերմենտների ճեղքման տեղերը խմբավորված են R906 գենոմի երկու շրջաններում: *pTk16* և *pBR322* վեկտորների վրա կլոնավորված են R906 ԴՆԹ-ի *EcoRI* և *HindIII* հատվածները, որոնք պարունակում են *str* և *sul* գենները: R906 ԴՆԹ-ի այլ շրջանները չեն կլոնավորվում այդ վեկտորների վրա:

Բլոտտինգ-հիբրիդիզացիայի միջոցով R906-ի քարտեզի վրա հայտնաբերված են *Inc P-1* պլազմիդներին յուրահատուկ հոմոլոգիայի երկու տարածական շրջաններ: Տվյալները ցույց են տալիս տերերի լայն սպեկտր ունեցող պլազմիդների մոլեկուլյար կազմակերպման միանման սկզբունքը:

MAPPING OF PLASMID R906, CHARACTERIZED BY BROAD SPECTRUM OF HOSTS

N. H. ASARYAN, V. A. SAKANYAN

Restriction maps of the R906 plasmid have constructed for the enzymes *EcoRI*, *BamHI* and *HindIII*. Cleavage sites have been clustered in two regions of R906 DNA. *EcoRI* — and *HindIII* — fragments of R906, containing *str* and *sul* genes, have been cloned on the vectors *pTK16* and *pBR322*. Other regions of the R906 DNA do not clone on these vectors. On the map of R906 two broad homologous regions have been found with the help of blotting-hybridization, specific for the plasmid *Inc P-1*. The data point out that plasmids with broad spectrum of hosts have the same principle of molecular organization.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Азарян Н. Г., Саканян В. А., Крупенко М. А., Алиханян С. И. Генетика, 18, 10, 1636, 1982.
2. Datta N., Hedges R. W. J. Gen. Microbiol., 70, 453, 1972.
3. Depicker A., Van Montagu M., Schell J. In: DNA insertion elements, plasmids and episomes (A. I. Bichari, J. Shapiro and S. L. Adhya, eds), 678, Cold Spring Harbor, N. Y., 1977.
4. Figurski D. H., Helinski D. R. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 76, 1648, 1979.
5. Figurski D. H., Pohlman R. F., Bechnofer D. H., Prince A. S., Kelton C. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1535, 1982.
6. Grinsted J., Bennett P. M., Richmond M. H. Plasmid, 1, 34, 1977.
7. Holloway B. W. Plasmid, 2, 1, 1979.
8. Kingsbury D. T., Helinski D. R. Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 1538, 1970.
9. Maniatis T., Jeffrey A. K., Kleid D. G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1184, 1975.
10. Meyer R., Figurski D., Helinski D. R. Mol. Gen. Genet., 152, 129, 1977.
11. Meyer R. J., Shapiro J. J. Bacteriol., 143, 1362, 1980.
12. Olsen R. H., Shipley P. L. J. Bacteriol., 113, 772, 1973.
13. Sakanyan V. A., Yacubov L. Z., Alikhanian S. I., Stepanov A. I. Mol. Gen. Genet., 165, 331, 1978.

14. Smith G. E., Summers M. D. Anal. Biochem., 109, 123, 1980.
15. Southern E. M. J. Mol. Biol., 98, 503, 1975.
16. Stanisch V., Ortiz J. M. J. Gen. Microbiol., 94, 281, 1978.
17. Thomas C., Meyer R., Helinski D. R. J. Bacteriol., 143, 213, 1980.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 10, 1983

УДК 635.64.575.127.2

НАСЛЕДОВАНИЕ САМОФЕРТИЛЬНОСТИ У ГИБРИДОВ САМОСОВМЕСТИМЫХ ВИДОВ *LYCOPERSICON* *S. L. HIRSUTUM* F. *GLABRATUM*

А. М. АГАДЖАНЫН, Е. М. НАВАСАРДЯН

Изучены гибриды первого поколения от скрещивания материнских самосовместимых видов томата с *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. Выявлено, что у гибридов всех комбинаций скрещивания имеет место повышение самосовместимости по сравнению с отцовским родителем *L. hirsutum* f. *glabratum*, который в качестве пестичного компонента отвергает пыльцу самосовместимых видов. Однако по выраженности этого признака они уступают соответствующим материнским компонентам. В результате этого чувствительность гибридных растений к инбридингу выражена еще достаточно сильно, что свидетельствует об их довольно высокой склонности к перекрестному опылению.

Ключевые слова: томат, самоопыление, перекрестное опыление, гибриды, самофертильность, система воспроизведения.

В предыдущих работах [1, 7] были рассмотрены реакция дикой самофертильной разновидности томата *L. hirsutum* f. *glabratum* на самоопыление и поведение ее потомства после одно-, четырехкратного инцухта. Показана высокая чувствительность *glabratum* к самоопылению и значительная инбредная депрессия в поколениях инцухта. Весьма чувствительными к самоопылению оказались также гибриды от скрещивания *glabratum* с различными сортами культурного томата [8]. Данные указывают на преобладание в системе воспроизведения этой формы и ее гибридов с *L. esculentum* перекрестного опыления.

В данном сообщении рассматривается отношение гибридов между *glabratum* и другими самосовместимыми видами томата к самоопылению.

Материал и методика. Исследовались гибриды F_1 , полученные от скрещивания самосовместимых видов *Lycopersicon* (♀) с *L. hirsutum* f. *glabratum* (образец 7924 по временному каталогу ВНИИР им. Н. В. Вавилова) и родительские формы. В опыте изучены гибриды *glabratum* с самосовместимыми видами и разновидностями *L. esculentum* var. *cerasiforme* (Вишневидный красный), *L. pimpinellifolium* (Смородиновидный красный, К—2920 и Смородиновидный желтый, К—2919), *L. cheesmanii* (К—вр. 7764), *L. cheesmanii* f. *minor* (К—вр. 7765), а также с культурным томатом сорта Midseason 427.

Применяли два варианта инбридинга: обычное самоопыление путем простого заключения нераскрывшихся еще цветков в изоляторы из кальки и искусственное само-