

3. Соколов І.Д., Шеліхов П.В., Соколова Т.І. та ін. Генетика. Практикум. – 4-е вид., виправлене та допов. К.: Арістей, 2003. – 176 с.
4. Брусенцова М.Ю. Спадкування плейотропних кількісних ефектів при тригибридному схрещуванні *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: Автореф. дис. ... кан. биол. наук: 03.00.15/ ВИР РАСХН. С.-Петербург, 1996. - 18 с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1990. – 351 с.
6. Сыч Е.И. Новый метод оценки взаимодействия генов в количественной генетике растений // Збірн. наук. праць Луганського НАУ. – 2003. - № 22 (34). – С. 65-71.

Резюме

Изучали взаимодействие картированных генов арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) *API*, *BP*, *GL1*, *CH5*, *CLV1* и *MIN* по признаку «масса растения». При совместном действии генов наблюдали как взаимодействие, так и аддитивное действие генов.

Вивчали взаємодію картованих генів арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) *API*, *BP*, *GL1*, *CH5*, *CLV1* та *MIN* за ознакою «маса рослин». При спільній дії генів спостерігали як взаємодію, так і адитивну дію генів.

The interaction of the mapped genes *API*, *BP*, *GL1*, *CH5*, *CLV1* and *MIN* of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh was studied according to the trait «the weight of plants». At joint action of genes we observed both their interaction and additive action of genes.

ТИТОК М.А., БУЛЫГА И. М., ВАСИЛЕНКО С.Л.

Белорусский государственный университет,

Беларусь, 220030, Минск, пр-т Независимости, 4, e-mail: titok@bsu.by

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ БИОДЕГРАДАЦИОННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ У ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS*

Горизонтальный перенос генов биодegradации, приводящий к распространению признаков утилизации органических соединений внутри и между микробными сообществами, осуществляется за счет конъюгационного переноса D-плазмид. Транспозонная организация катаболитных оперонов предполагает, что входящие в их состав гены, обладая высокой степенью пластичности, могут распространяться среди бактериальных популяций, повышая адаптивные свойства микроорганизмов. Рекомбинационные события, обеспечивающие транспозицию мобильных генетических элементов, а также факторы внешней среды и различное генетическое окружение могут приводить к изменению генетической организации детерминант деградации органических соединений. В этом плане определенный интерес представляют гены *nahAc* и *nahG*, входящие соответственно в состав «верхнего» и «нижнего» *nah*-оперонов и детерминирующие ферменты с широкой субстратной специфичностью. Об эволюционных преобразованиях данных генетических детерминант могут свидетельствовать мутационные изменения, в результате которых образуются полиморфные локусы, а также наличие дублированных генов, дивергенция которых способствует возникновению новых ферментативных активностей. Наличие определенных сочетаний генетических детерминант в составе различных бактериальных репликонов может являться результатом рекомбинационных событий, приводящих к модификационной изменчивости генетического материала. Понимание процессов и закономерностей, лежащих в основе преобразований систем

биодegradации, способствует пониманию возможных путей их эволюции и создает предпосылки для их практического использования, в частности, целенаправленного создания эффективных экологически безопасных технологий очистки окружающей среды и микробиологического синтеза биотехнологически значимых соединений.

Целью настоящей работы явился анализ нуклеотидных последовательностей генов с широкой субстратной специфичностью *nahAc* и *nahG*, определяющих синтез ключевых ферментов деградации нафталина (соответственно нафталин-1.2-диоксигеназы и салицилат-1-гидроксилазы) и особенностей их распространения среди природных нафталинутилизирующих бактерий *Pseudomonas*, выделенных из загрязненных природных источников на территории Беларуси.

Материалы и методы

В работе использовали 102 штамма нафталинутилизирующих бактерий, выделенных из загрязненных нефтепродуктами почв на территории Беларуси, а также типовые штаммы *Pseudomonas* (Всесоюзная Коллекция Микроорганизмов и Вирусов, Москва, Россия).

Среды. Бактерии выращивали в минимальной среде M9 [1]. Источником углерода служил нафталин в концентрации 100 мкг/мл.

Выделение тотальной ДНК осуществляли с использованием саркозидового метода [2].

Физиолого-биохимические тесты для определения видовой принадлежности выделенных бактерий, проводили согласно [3].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием набора реактивов TaKaRa Ex TaqTM (Япония).

Для амплификации генов 16S рНК, большой субъединицы нафталин-1.2-диоксигеназы (*nahAc*) и салицилат-1-гидроксилазы (*nahG*), а также *rep*-генов плазмид IncP-7 и IncP-9 использовали, соответственно, олигонуклеотидные праймеры: 8f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') и 1492r (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3'); Ac149f (5'-CCC YGG CGA CTA TGT-3') и Ac1014r (5'-CTC RGG CAT GTC TTT TTC-3'); *shc1_up* (5'-CGG CKT THG GTG ARG TCG GTG C-3') и *shc1_lo* (5'-GGC GAG GAA RTA GGC GTC CTC AAG 3'), *rep7f* (5'-CCC TAT CTC ACG ATG CTG TA-3') и *rep7r* (5'-GCA CAA ACG GTC GTC AG-3'), *repF* (5'-CCA GCG CGG TAC WTG GG-3') и *repR* (5'-GTC GGC AIC TGC TTG AGC TT-3').

Для получения ампликонов генов 16S рНК размером 1484 п.н., гена *nahAc* размером 865 п.н. и *rep*-генов плазмид IncP-7, IncP-9 размером 398 п.н. и 524 п.н., соответственно, использовали режимы амплификации, предложенные в работах [4-**Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Для получения специфических продуктов ПЦР гена *nahG* размером 893 п.н. использовали модифицированный в ходе выполнения работы режим амплификации: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 30 сек, 64°C – 30 сек, 72°C – 1.5 мин (7 циклов); 94°C – 30 сек, 68°C – 30 сек, 72°C – 1.5 мин (23 цикла), 72°C – 10 мин (1 цикл).

Рестрикцию продуктов амплификации осуществляли с помощью ферментов *MspI*, *RsaI*, *HaeIII* в условиях, рекомендованных фирмой изготовителем (Fermentas, Литва). В качестве реперной ДНК для определения размеров фрагментов использовали синтетические DNA Ladder Mix и 100-bp DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Электрофоретический анализ проводили согласно [1].

Результаты и обсуждение

Из различных загрязненных нефтепродуктами почв на территории республики Беларусь было изолировано более 100 штаммов бактерий, способных утилизировать в качестве единственного источника углерода и энергии нафталин. На начальном этапе работы из клеток всех изолированных бактерий выделяли тотальную ДНК, которую вносили в качестве матрицы в полимеразную цепную реакцию. При этом использовались праймеры, обеспечивающие амплификацию детерминант *nahAc* и

nahG, генов 16S рРНК, а также *rep*-генов плазмид группы IncP-7 и IncP-9. Полученные специфические продукты амплификации подвергали рестрикции мелкощепящими рестриктазами HaeIII, MspI и RsaI.

Рестрикционный анализ продуктов амплификации генов *nahAc* и *nahG*, показал, что природные нафталинутилизирующие бактерии содержат известные типы генов *nahAc* (AN10, C18 и A88) и *nahG* (NAH7, AN10, pDTG1 и KF715) [5-6]. В пределах типа C18 гена *nahAc* впервые обнаружен полиморфизм (обозначены как типы C18_V1, C18_V2 и C18_V3). Кроме того, описана новая последовательность гена *nahG* (обозначена как тип AL10), а для 35 штаммов показано сходство рестрикционных профилей ампликонов гена *nahG* с типом A88 в случае рестриктазы MspI и с типом NAH7 в случае рестриктазы RsaI (обозначены как тип A88-NAH7). Было установлено, что среди нафталинутилизирующих бактерий, выделенных на территории Беларуси, преобладают гены *nahAc*-типа C18_V1 (36 штаммов) и A88 (35 штаммов), реже встречаются типы C18_V2 (19 штаммов) и AN10 (9 штаммов), а тип C18_V3 выявлен только для двух проанализированных штаммов. Наиболее распространенными типами *nahG*-гена среди нафталинутилизирующих бактерий белорусской коллекции являются типы pDTG1 (37 штаммов), A88-NAH7 (35 штаммов) и NAH7 (19 штаммов). Реже встречались типы KF715 (7 штаммов), AN10 (2 штамма) и AL10 (2 штамма).

Анализ полученных данных позволил установить, что различные типы генов *nahAc* и *nahG* встречаются в определенных сочетаниях. В частности, типы A88, C18_V1, C18_V2 и C18_V3 гена *nahAc* соответственно совместно наследуются с типами A88-NAH7, pDTG1, NAH7 и AL10 гена *nahG*. Исключение составляет тип AN10 гена *nahAc*, сочетающийся с двумя близкородственными последовательностями *nahG*-гена типа AN10 и KF715 [6]. Несмотря на высокую консервативность аминокислотных последовательностей ключевых ферментов метаболизма нафталина NahAc и NahG, наличие нуклеотидных замен в детерминируемых их генах свидетельствует о происходящих в природе процессах дивергенции. Сопряженный характер наследования определенных типов генетических детерминант может быть обусловлен рекомбинационными перестройками, приводящими к локализации в одном репликоне адаптированных относительно друг друга нуклеотидных последовательностей, обеспечивающих их нормальную функциональную активность.

На основании физиолого-биохимической характеристики и рестрикционного анализа продуктов амплификации генов 16 S РНК большинство выделенных нафталинутилизирующих бактерий было отнесено к группе флюоресцирующих псевдомонад, а именно *P. fluorescens* (49 штаммов) и *P. putida* (31 штамм). Бактерии *Pseudomonas* не синтезирующие флюоресцирующий пигмент, были отнесены к *P. stutzeri*, *P. species* V4 (5 штаммов) *P. species* V2 (13 штаммов) и *P. species* V3 (1 штамм). При этом не было выявлено каких-либо закономерностей, свидетельствующих о взаимосвязи определенных типов детерминант *nahAc* и *nahG* с типом бактериального хозяина.

Проведенный в данной работе ПЦР-анализ с последующей рестрикцией продуктов амплификации, позволил выявить четыре типа плазмидных репликонов, два из которых являются наиболее многочисленными (53 штамма) и принадлежат к группе IncP-9 (δ - и ζ -подгруппа), четыре штамма (AL1, AL2, AL9, AL38) содержат плазмиды группы IncP-7, два штамма (AL3, AL43) несут бирепликонные плазмиды IncP-7/IncP-9 (δ - подгруппа). Для большого числа штаммов (45 штаммов) не было получено продуктов амплификации с использованными праймерами. При сравнении типов плазмидных репликонов с типами последовательностей генов *nahAc* и *nahG* выявились некоторые особенности. Оказалось, гены *nahAc* и *nahG* в комбинации C18_V2/NAH7 выявляются в штаммах, содержащих только плазмиды ζ -подгруппы IncP-9, тогда как другие сочетания данных детерминант встречаются в клетках, несущих плазмиды

группы IncP-9 (δ -подгруппа), IncP-7 или другие типы репликонов, которые в свою очередь могут отличаться между собой.

На основании полученных данных можно предположить существование связи между типами детерминант *nahAc* и *nahG* и особенностями организации содержащих их репликонов. В отличие от известных, только у плазмид ζ -подгруппы IncP-9 *nah*-опероны локализованы в области конъюгационного переноса между генами *tra* и *mpf* [8]. Нарушения данного локуса за счет рекомбинационных перестроек, возникающих при встраивании генетического материала, в том числе генов биodeградации, должны приводить к элиминации плазмид из бактериальной популяции. Кроме того, в отличие от внехромосомных генетических элементов других классификационных групп, *nah*-гены входят в состав транспозона (Tn4655), не содержащего гена *tnpA*, детерминирующего синтез белка транспозиции [9], что должно затруднять или снижать вероятность его перемещения в естественной среде обитания. Таким образом, обнаружение только определенных типов детерминант *nahAc* (C18_V2) и *nahG* (NAH7) в составе плазмид ζ -подгруппы IncP-9 может свидетельствовать в пользу их более консервативной организации по сравнению с репликонами других классификационных групп.

Тем не менее, гены *nahAc* и *nahG*, входящие в состав двух *nah*-оперонов, в целом характеризуются высокой степенью консервативности. Одиночные замены нуклеотидов, присутствующие в данных локусах, не приводят к смене функций. Определенные комбинации данных детерминант в составе одного репликона могут лишь свидетельствовать о сопряженном характере их изменений и являться результатом ограниченного числа рекомбинационных перестроек. Эволюционные преобразования систем биodeградации должны быть связаны с возникновением дупликаций определенных *nah*-генов с последующей их дивергенцией. В пользу этого свидетельствуют данные о присутствии дополнительных генов, детерминирующих ферменты с широкой субстратной специфичностью в составе плазмидных [7, 10] и хромосомных геномов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы INTAS 01-2383, гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Б04М-116 и задания 1.08 ГППИ «Новые биотехнологии».

Литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. 1984.- 480с.
2. Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1986.- vol. 8, № 8.- P.2541-2545.
3. Смирнов В.В., Куприянова Е.А. 1990. Бактерии рода *Pseudomonas*. – Киев.- 1990.- 262с.
4. Weisburg W.G., Barnes S.M., Pelletier D.A. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol.- 1991.-vol. 173, № 2.- P.697-703.
5. Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat L. et al. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region // Appl. Environm. Microbiol.- 2002.- vol. 68, № 2.- P.957–962.
6. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л. и др. Разнообразие генетических систем биodeградации нафталина у штаммов *Pseudomonas fluorescens* // Микробиология.- 2005.- vol. 74, № 1.- P.60–68.
7. Li, W., Shi, J., Wang, X., Han, Y. et al. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6 // Gene.- 2004.- vol. 336, № 2.- P.231–240.
8. Sota M., Yano H., Ono A. et al. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase // J Bacteriol.- 2006.- vol. 188, № 11.- P.4057–4067.

9. Tsuda M., Iino T. Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon // *Mol. Gen. Genet.* - 1990.- vol. 223, № 1.- P.33–39.
10. Bosch R., Moore E.R., Garcia-Valdes E. et al. NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10 // *J. Bacteriol.* - 1999.- vol. 181, № 8.- P.2315–2322.

Резюме

В результате анализа природных репликонов выявлены уникальные сочетания генов *nahAc* и *nahG*, обеспечивающих синтез ключевых ферментов катаболизма нафталина. Определенные комбинации исследованных детерминант входят в состав разных репликонов за исключением типа C18_V2/NAH7, характерного для бактерий, содержащих плазмиды ζ -подгруппы IncP-9.

У винику аналізу природних репліконів виявлені унікальні поєднання генів *nahAc* і *nahG*, забезпечуючих синтез ключових ферментів катаболізму нафталіна. Певні комбінації дослідованих детермінант входять до складу різних репліконів, за виключенням типу C18_V2/NAH7, характерного для бактерій, що містять плазмиди ζ -підгрупи IncP-9.

Analysis of genetic determinants *nahAc* and *nahG*, coding for key enzymes in naphthalene catabolism, showed that these genes occur in unique matches. Combinations of the genes *nahAc* and *nahG* are included in different replicons excluding C18_V2/NAH7 type, which is typical of bacteria, containing ζ -subgroup IncP-9 plasmids.

ТОЦКИЙ В.Н., ХАУСТОВА Н.Д., БЕЛОКОНЬ С.В.

*Одесский национальный университет им. И.И.Мечникова,
Украина, 65026, Одесса, ул. Дворянская, 2, e-mail: caphgen@ukr.net*

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ И ГЕННЫЙ БАЛАНС

Накопленные экспериментальные данные дают основания считать, что межлинейные и популяционные отличия адаптивных реакций на конкретные неблагоприятные условия среды в значительной степени связаны с множественным аллелизмом определенных структурных генов, имеющих то или иное отношение к механизмам устойчивости [1 – 3]. Из серии множественных аллелей в ответ на отрицательное влияние среды в популяции отбирается именно та структурная разновидность гена, которая при данных условиях имеет селективное преимущество [4 – 6]. Очевидно, в каждом локусе хромосом при определенных условиях существования генотипа преимущественно должны находиться лишь определенные аллели генов, способные при данных условиях оптимально взаимодействовать и поддерживать генный баланс. Таким образом, под влиянием экологических факторов в генотипах особей популяции формируются определенные совокупности коадаптированных аллелей, названные [7, 8] адаптационными комплексами генов (АКГ), которые определяют устойчивость особей к различным факторам среды.

Понятно, что любые манипуляции с геномом, направленные на создание нового исходного материала для селекции, приводят к существенным перестройкам генного баланса и, следовательно, к определенным изменениям адаптивной способности синтезированных генотипов. Бурное развитие генетической инженерии, интенсивное использование в селекции методов хромосомной и геномной инженерии, приведшее к созданию множества интрогрессивных форм, вызвало необходимость изучения