

Приведенные выше результаты позволяют сделать вывод, что проростки, происходящие из гаплоидных множественных почек риса, могут служить хорошим источником гаплоидных протопластов. Используя выращиваемые *in vitro* множественные почки, можно изменять способы предобработки и процедуру культивирования протопластов для упрощения процессов их изоляции и последующего культивирования. Мы надеемся также, что изолированные таким способом протопласты могут быть сопоставимы с мезофильными протопластами, выделенными непосредственно из нормальных и интактных растений, и являться основой физиологически и эпигенетически гомогенного стерильного материала для работы с гаплоидными протопластами в течение всего года и в любых климатических условиях. Такая система, вероятно, перспективна для риса, злакового растения, а также для других растений, в том числе и двудольных, при модельных исследованиях *in vitro*.

#### A SIMPLE METHOD FOR ISOLATION OF HAPLOID PROTOPLASTS FROM FORMS OF RICE MULTISHOOTS

Huynh Xuan Thao, Trinh Manh Dung, Ngo Ke Suong

Institute of Experimental Biology, Ho Chi Minh City, Vietnam

#### Summary

One-month old sterile plantlets grown on the 0.3 M sucrose medium were used for protoplast isolation. The young part of leaves were cut onto small pieces (1 mm) and left for over night incubation in the 2% v/v driselase solution containing glucose 0.4 M. Isolated protoplasts were purified by two-phase centrifugation (the upper phase contains solution of salts, the lower one—0.4 M of sucrose and other nutritional constituents). The purified protoplasts were suspended between two phases.

1. *Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources* / C. C. Chu, C. C. Wang, C. S. Sun et al. // *Sci. Sinica*.— 1975.— N 5.— P. 659—668.
2. *King P. J., Potrykus I., Thomas E. In vitro genetics of cereals: problem and perspectives* // *Physiol. Veg.*— 1978.— 16, N 2.— P. 381—399.
3. *Further studies on plantlet production from cultured tissues of Sorghum bicolor* / D. I. Dunstan, K. C. Short, H. Dhaliwal et al. // *Protoplasma*.— 1979.— 101, N 4.— P. 355—361.
4. *Thomas E., King P. J., Potrykus I. Improvement of crop plants via single cells in vitro — an assessment* // *Z. Pflanzenzucht*.— 1979.— 82, N 1.— P. 1—30.
5. *Vasil I. K. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses* // *Genetic engineering in eukaryotes* / Eds P. F. Lurquin, A. Kleinhofs.— New York: Plenum Publ. Co., 1983.— P. 233—252.
6. *Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений.*— Киев: Наук. думка, 1984.— 160 с.
7. *Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures* // *Physiol. Plant*.— 1962.— 15, N 4.— P. 473—497.

Ин-т эксперим. биологии Нац. центра  
науч. исследований СРВ, Хошимин

Получено 04.06.86

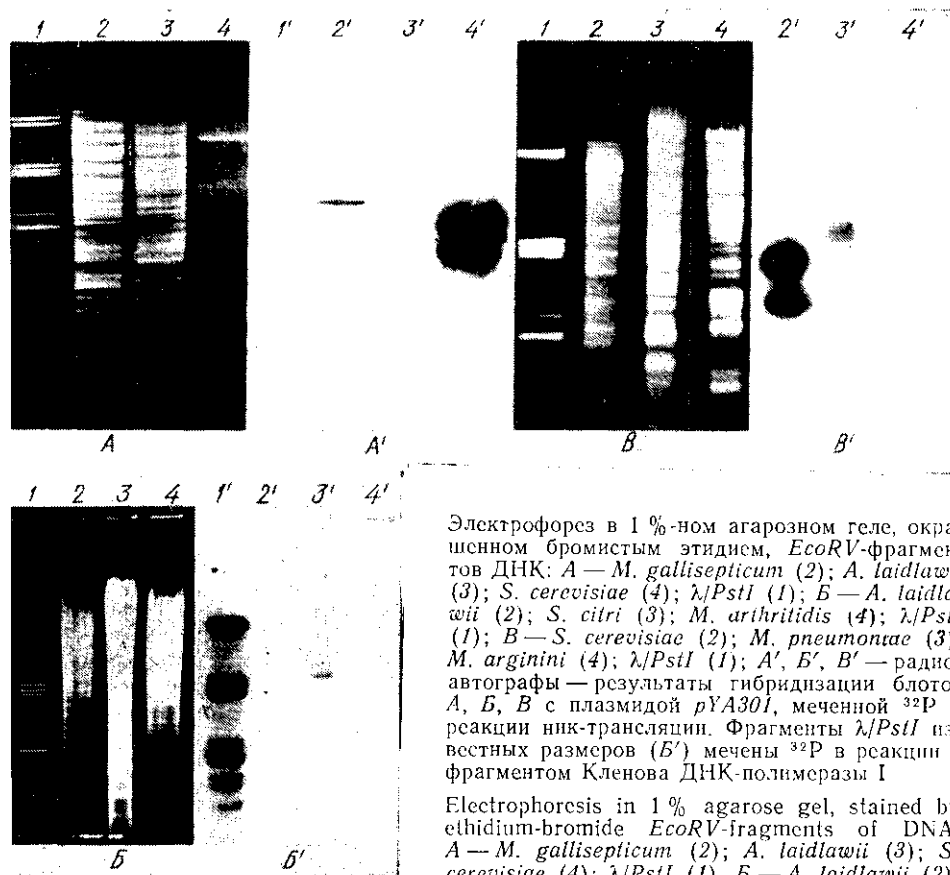
УДК 579.887.111:579.252

### В ДНК МИКОПЛАЗМ, ОБЛАДАЮЩИХ ПОДВИЖНОСТЬЮ, ОБНАРУЖЕНЫ ФРАГМЕНТЫ, ГОМОЛОГИЧНЫЕ ГЕНУ АКТИНА ЭУКАРИОТ

О. А. Чернова, Н. А. Меркулова, С. Н. Борхсениус

Микоплазмы — собирательное название представителей класса *Mollicutes* — самых малых из свободноживущих прокариотических организмов. Большинство микоплазм — симбионты, многие — паразиты, некоторые микоплазмы — возбудители болезней человека, животных, растений [1, 2]. Как правило, они неподвижны, но некоторые патогенные микоплазмы, в частности, *Mycoplasma pneumoniae* (возбудитель атипичной пнев-

они человека), *Mycoplasma gallisepticum* (возбудитель респираторных заболеваний птиц) обладают так называемой скользкой подвижностью, а спиралевидные клетки *Treponema pallidum*, вызывающей поражения цитрусовых, способны активно вращаться и окрашиваться [3, 4]. Предполагается, что у этих микоплазм имеется цитоскелет, тогда как среди других прокариот, включая микоплазмы, не обладающие подвижностью, цитоскелетоподобные образования неизвестны [5, 6]. У всех эукариот в сохранении



Электрофорез в 1 %-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, *EcoRV*-фрагментов ДНК: А — *M. gallisepticum* (2); *A. laidlawii* (3); *S. cerevisiae* (4);  $\lambda/PstI$  (1); В — *A. laidlawii* (2); *S. citri* (3); *M. arthritidis* (4);  $\lambda/PstI$  (1); В' — *S. cerevisiae* (2); *M. pneumoniae* (3); *M. arginini* (4);  $\lambda/PstI$  (1); А', В', В' — радиоавтографы — результаты гибридизации блотов А, В, В' с плазмидой pYA301, меченой  $^{32}P$  в реакции ник-трансляции. Фрагменты  $\lambda/PstI$  известных размеров (В') мечены  $^{32}P$  в реакции с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I

Electrophoresis in 1% agarose gel, stained by ethidium-bromide *EcoRV*-fragments of DNA: А — *M. gallisepticum* (2); *A. laidlawii* (3); *S. cerevisiae* (4);  $\lambda/PstI$  (1), В — *A. laidlawii* (2); *S. citri* (3); *M. arthritidis* (4);  $\lambda/PstI$  (1); В' — *S. cerevisiae* (2); *M. pneumoniae* (3); *M. arginini* (4);  $\lambda/PstI$  (1); А', В', В' — autoradiographs — results of hybridization of А, В, В' blots with plasmid pYA301  $^{32}P$  labelled in the reaction of nick-translation,  $\lambda/PstI$  fragments of the known sizes (В') are  $^{32}P$  labelled in the reaction with Klenow DNA-polymerase I fragment

*S. cerevisiae* (2); *M. pneumoniae* (3); *M. arginini* (4);  $\lambda/PstI$  (1); А', В', В' — радиоавтографы — результаты гибридизации блотов А, В, В' с плазмидой pYA301 меченой  $^{32}P$  в реакции ник-трансляции. Фрагменты  $\lambda/PstI$  известных размеров (В') мечены  $^{32}P$  в реакции с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I

формы клетки и клеточном движении принимает участие цитоскелет, одним из основных элементов которого являются микрофиламенты, содержащие актин.

Из клеток микоплазм, обладающих подвижностью, ранее были выделены актиноподобные белки. Актиноподобный белок *M. pneumoniae* связывается с антителами к мышечному актину кролика и реагирует с фаллоидином. Белок с молекулярной массой 46000, способный полимеризоваться в 0,6 М КСl и деполмеризоваться в слабом растворе соли, был выделен из *M. gallisepticum*. Подвижность *M. gallisepticum* ингибируется цитохолозином В. Из клеток *S. citri* выделен белок, активно связывающийся с антителами к актину беспозвоночных [4, 7—9].

В ДНК *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *S. citri* нами обнаружены фрагменты ДНК, гомологичные гену актина дрожжей. На рисунке представлены данные по блот-гибридизации рестриктазных фрагментов ДНК ряда микоплазм с плазмидой pYA301, содержащей ген актина *S. cerevisiae* (плазмида pYA301 любезно предоставлена Д. Галлитцем, Марбург. ун-т, ФРГ). В ДНК микоплазм, не обладающих подвижностью (*Acholeplasma laidlawii*, *M. arthritidis*, *M. arginini*), фрагменты, гибридизующиеся с этим геном, не обнаружены.

Гибридуемость фрагментов генома микоплазм, обладающих подвижностью, с эукариотическим геном актина дрожжей, позволяет предположить две возможности

появления актиноподобных генов у микоплазм: 1) изначальная общность происхождения актиноподобных молекул; 2) «горизонтальный перенос» гена от клетки-хозяина к микоплазме, поскольку в природе микоплазмы всегда находятся в тесной связи с клетками хозяев. Микоплазмы растений и насекомых — внутриклеточные паразиты, а размножение микоплазм, паразитирующих на поверхностных мембранах клеток млекопитающих, может, по-видимому, происходить как вне, так и внутри клеток [10]. Характер взаимодействия микоплазмы с клетками хозяина не исключает возможности обмена генетическим материалом [11]; в ряде случаев изменения клеток под действием микоплазм при длительных инфекциях сравнивают с изменениями, продуцируемыми интеграционными вирусами [12]. Известно, что сайты ДНК, критичные для интеграции вирусов, связаны с длинными концевыми повторами вирусов [13]. ДНК всех проверенных нами микоплазм содержат фрагменты, гомологичные длинным концевым повторам вируса Раушера [14].

Сопоставление последовательностей нуклеотидов в клонированных «актиноподобных» последовательностях позволит прояснить природу их происхождения в ДНК микоплазм.

#### THE DETECTION OF THE FRAGMENTS HOMOLOGOUS TO EUKARYOTIC ACTIN GENE IN DNAs OF MOBILE MYCOPLASMAS

O. A. Chernova, N. A. Merkulova, S. N. Borhsenius

Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

#### Summary

The fragments homologous to actin gene of *Saccharomyces cerevisiae* have been revealed in DNAs of mobile mycoplasmas (procaryotic organisms): *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Spiroplasma citri*. The fragments homologous to actin gene of *Saccharomyces cerevisiae* have not been revealed in DNAs of immobile mycoplasmas.

The presence of such fragments in DNAs of mycoplasmas can be consequence of common origin of actin-like molecules in cells of different organisms or "horizontal transfer" of actin gene (from host cell to mycoplasma cell).

1. Борхсениус С. Н., Чернова О. А. Микоплазмы // Цитология.— 1987.— 29, № 4 — С. 379—390.
2. Razin S. Molecular biology and genetics of *Mycoplasmas* (Mollicutes) // Microbiol. Rev.— 1985.— 49, N 4.— P. 419—455.
3. Bove J. M., Saillard C. Cell biology of spiroplasmas. Motility // The mycoplasmas.— New York: Acad. press, 1979.— Vol. 3.— P. 120—133.
4. Brecht W. Motility // Ibid.— Vol. 1.— P. 141—156.
5. Kahane I., Granek J., Reisch-Soad A. The adhesions of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. pneumoniae* // Ann. Microbiol.— 1984.— 135A.— P. 25—32.
6. Townsend R., Burgess J., Plaskitt K. A. Morphology and ultrastructure of helical and nonhelical strains of *Spiroplasma citri* // J. Bacteriol.— 1980.— 142, N 3.— P. 973—981.
7. Göbel U. Supramolecular structures in *Mycoplasmas* // Yale J. Biol. Med.— 1983.— 56, N 5—6.— P. 695—700.
8. Maniloff J., Chaudhuri U. Gliding mycoplasmas are inhibited by cytohalasin B and contain a polymerizable protein fraction // J. Supramol. Struct.— 1979.— 12, N 3.— P. 299—304.
9. Neimark H. *Mycoplasma* and bacterial proteins resembling contractile proteins: a review // Yale J. Biol. Med.— 1983.— 56, N 5—6.— P. 419—423.
10. Прозоровский С. В., Прохин А. В., Санин А. В. Иммунологические механизмы персистенции микоплазм // Вестн. АМН СССР.— 1985.— № 10.— С. 43—51.
11. Каган Г. Я. Микоплазмология — новая отрасль микробиологии // Микробиол. журн.— 1981.— 43, № 3.— С. 393—404.
12. Fogh J., Fogh H. Chromosomal changes in cell culture induced by mycoplasma infection // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1973.— 225.— P. 311—319.
13. Хесин Р. Б. Непостоянство генома.— М.: Наука, 1985.— 472 с.
14. Геном микоплазм: оценка возможности «горизонтального» переноса фрагментов ДНК / С. Н. Борхсениус, О. А. Чернова, Н. А. Меркулова, А. Ф. Арэ // Тез. Всесоюз. биохим. съезда.— Киев, 1986.— Т. 2.— С. 347.

Ин-т цитологии АН СССР, Ленинград

Получено 15.12.86