

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНОЙ ДНК ГРИБА *Verticillium Dahliae* Kleb

Р. С. Мухамедов, Э. Г. Холмуратов, А. А. Абдукаримов

Исследования по молекулярной генетике гриба-возбудителя вертициллезного увядания хлопчатника *V. dahliae* крайне ограничены. В частности, до настоящего времени в литературе не имеется работ по физическому картированию генома гриба с помощью рестриктаз. Знание структурной организации генома *V. dahliae* позволит не только дифференцировать отдельные генетические или физиологические расы гриба, характеризующиеся различной патогенностью, но и является совершенно необходимым для понимания молекулярно-генетических процессов, лежащих в основе гиперпластической изменчивости этого возбудителя вертициллезного увядания хлопчатника и ряда других сельскохозяйственных культур.

Рестрикционный анализ широко применяется для предварительной характеристики общей структурной организации геномов различных видов. Этот метод дает возможность качественно и количественно охарактеризовать семейство средне- и высокоповторяющихся последовательностей в геноме и в некоторых случаях позволяет выявить существенные структурные



Рис. 1. Очистка ДНК *V. dahliae* в градиенте плотности хлористого цезия и бромистого этидия

Fig. 1. Purification of *V. dahliae* DNA in the gradient density of CsCl and EtBr.

отличия даже у близких видов. Можно предположить, что различные генетические расы гриба могут быть дифференцированы этим методом.

В этой связи нами проведен рестрикционный анализ ядерной ДНК гриба *V. dahliae*. Подобные исследования затруднены необходимостью получения протопластов из мицелия гриба и высокоочищенной ДНК, доступной для переваривания рестриктазами.

Получение протопластов из мицелия. Для получения протопластов штамм *V. dahliae* (вирулентный штамм № 26 из отдела вилта Среднеазиат. НИИ защиты растений) выращивали в 100 мл среды Чапека [1] при 28 °С в течение 7 сут на качалке. Мицелий собирали центрифугированием при 5000 об/мин 20 мин и промывали три раза буфером, содержащим 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, и 50 мМ ЭДТА, из расчета 5 мл буфера на 1 г мицелия. Осадок измельчали в гомогенизаторе Поттера и промывали тем же буфером, содержащим 0,1 мл β-меркаптоэтанол в 10 мл воды, инкубировали 15 мин при 20 °С. Клетки суспендировали в буфере (0,1 М Na-цитрат, рН 7,5, 1 М сорбитол, 60 мМ ЭДТА, 100 мкл улиточного фермента (β-глюкоуранидазы из *Helix pomatia* «Serva», ФРГ)) и оставляли при комнатной температуре на 15 ч. После фильтрования через капроновое сито суспензию протопластов центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Количество и качество протопластов контролировали с помощью светооптического микроскопа.

Выделение ДНК. К осадку протопластов медленно добавляли 0,1 мл 50 мМ трис-НСl-буфера, рН 8,0, содержащего 50 мМ ЭДТА, и 0,5 мл 20 %-ного саркозила. Осторожно перемешивали при 0 °С 15 мин, затем центрифугировали при 7000 об/мин 100 мин, 0 °С.

К 7,9 мл супернатанта добавляли 8 г CsCl, бромистый этидий из расчета 0,5 мкг/мл и оставляли на ночь. Центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин. Супернатант ультрацентрифугировали в роторе 60 Ti при 40000 об/мин 48 ч. Полоса ДНК была видна в УФ-свете (рис. 1). Бромистый этидий удаляли экстракцией *n*-бутанолом, насыщенным 3 М NaCl и 0,3 М цитратом натрия. Диализовали ДНК против ТЕ-буфера и осаждали этиловым спиртом.

ДНК расщепляли рестриктазами, полученными из НПО «Фермент», Вильнюс. Электрофоретический анализ рестрикционной ДНК осуществляли в 1 %-ном вертикальном агарозном геле.

Дот-гибридизацию проводили по методике фирмы «Amersham» (Англия). Пробы ДНК нагревали в водяной бане 5 мин при 95 °С и охлаждали во льду. На фильтры Hybond N («Amersham») наносили по 2 мкл, подсушивали, денатурировали в 1,5 М NaCl, 0,5 М NaOH 1 мин и затем переносили в буфер для нейтрализации (0,5 М трис-HCl, pH 7,2, 1,5 М NaCl, 0,001 М ЭДТА). Фильтр высушивали на воздухе и облучали 4 мин под УФ-светом.

Препараты ДНК метили по [2] с использованием в качестве меченого предшественника ^{32}P -дЦТФ.

Рестрикционный анализ проводили по стандартным методикам [3]. Для расщепления ДНК использовали пять различных рестриктаз — *BamHI*, *MspI*, *BspRI*, *Sau3A*,

Sau96I. В результате получилась сложная картина, представленная большим количеством полос (рис. 2) и резко отличающихся от таковых, полученных ранее для геномов других видов грибов. Для нее прежде всего характерно почти полное отсутствие, по крайней мере в области фрагментов ДНК большой молекулярной массы, фона, образующегося за счет расщепления уникальных последовательностей генома. Эта ситуация повторяется в экспериментах с расщеплением как мелко-, так и крупноцепящими рестриктазами.

Полосы имеют разную интенсивность, что свидетельствует о различной частоте повторов отдельных последовательностей в геноме, но сам факт образования такой сравнительно простой рестриктной картины может отражать только наличие очень большого числа повторяющихся

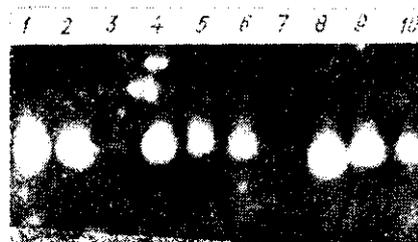
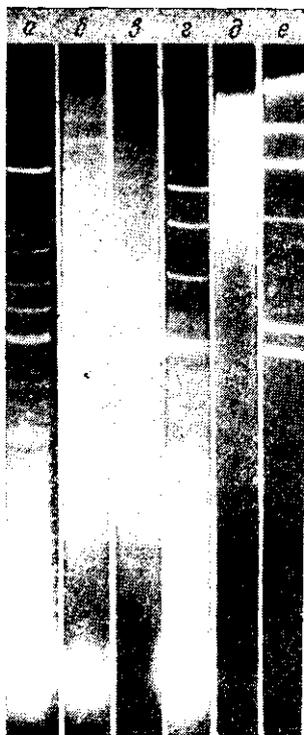


Рис. 2. Расщепление ДНК вирулентного штамма *V. dahliae* рестрикционными эндонуклеазами (электрофорез в 1 %-ном геле агарозы): *MspI* (а); *BspRI* (б); *BamHI* (в); *Sau3A* (г); *Sau96I* (д); ДНК фага λ , расщепленная рестриктазой *HindIII* (е)

Fig. 2. Cleavage of virulent strain *V. dahliae* DNA by the restriction endonucleases (in 1 % agarose gel electrophoresis): а) *MspI*; б) *BspRI*, в) *BamIII*; г) *Sau3A*; д) *Sau96I*; DNA of phage λ , splitted by the restriction endonuclease *HindIII* (e)

Рис. 3. Дот-гибридизация ДНК *V. dahliae* хлопчатника (количество ДНК — 1 мкг каждой) с ДНК: *G. hirsutum*, сорт 108-Ф (1); *G. arboreum*, сорт 02906 (2); фага λ (3); *G. hirsutum*, сорт Ташкент-1 (4); *Ssp mexicanum* (5); *G. barbadense*, сорт С-6037 (6); плазмиды *pBR322* (7); *G. hirsutum*, сорт С-4727 (8); *G. hirsutum*, сорт Ташкент-6 (9); *Ssp punctatum*, var. *Hopi* (10)

Fig. 3. Dot-hybridization of *V. dahliae* DNA with the cotton DNA (the quantity of DNA — 1 μg each): *Gossipium hirsutum*, cultivar 108-F (1); *G. arboreum*, cultivar 02906 (2); DNA of phage λ (3); *G. hirsutum*, cultivar Tashkent-1 (4); *Ssp mexicanum* (5); *G. barbadense*, cultivar C-6037 (6); DNA of *pBR322* plasmid (7); *G. hirsutum*, cultivar C-4727 (8); *G. hirsutum*, cultivar Tashkent-6 (9); *Ssp punctatum*, var. *Hopi* (10)

последовательностей в геноме гриба. Это согласуется с данными, полученными и на других грибах [4]. Вполне вероятно, что высокую скорость изменчивости *V. dahliae* можно объяснить множественными процессами рекомбинаций, обусловленными наличием большого числа повторов. Анализ литературы по исследованиям грибов *Neurospora crassa* [5], *Aspergillus nidulans* [6] и др. показывает, что большая часть повторяющихся последовательностей представлена рДНК [7].

Данные кросс-гибридизации ядерной ДНК гриба *V. dahliae* с ДНК различных видов хлопчатника свидетельствуют о наличии корреляции между степенью поражае-

мости грибом-патогеном и степенью гибридизации (рис. 3). Интенсивность гибридизации ДНК гриба с ДНК различных сортов и видов хлопчатника уменьшается в ряду: С4727, 108-Ф, Ташкент-1, Ташкент-6, *Ssp mexicanum*, *Ssp punctatum* var. *Норі*, *Gossypium barbadense*, С-6037, что точно коррелирует с вилтоустойчивостью. Разница в интенсивности гибридизации, по-видимому, определяется различием степени гомологии (условия отмывки фильтра после гибридизации были достаточно жесткими). Это соответствует данным, полученным ранее с помощью гибридизации в растворе [8]. Однако мы надеемся, что примененный нами подход (расщепление рестриктазами, фракционирование в агарозном геле и последующая кросс-гибридизация) позволит не просто показать факт гомологии, но и выделить, проклонировать и, возможно, определить функции гомологичных последовательностей, что дало бы возможность приступить к детальному исследованию молекулярных механизмов патогенеза.

RESTRICTION ANALYSES OF DNA OF FUNGI *VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEB

R. S. Mukhamedov, E. G. Kholmuratov, A. A. Abdukarimov

Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Summary

The protoplasts of fungi *Verticillium dahliae* Kleb were obtained, the nuclear DNA was isolated, the restriction analysis by restrictases *Bam*HI, *Hind*III, *Bsp*RI, *Sau*3A, *Sau*96I was made. Under these conditions the high repeated sequences of ribosomal genes were probably revealed.

The cross-hybridization of DNA from different cotton species and cultivars with DNA of the pathogene fungus revealed a correlation between a degree of damage by *Verticillium dahliae* and a degree of hybridization of homologous sequences.

1. Крашенинников И. А. Получение протопластов гриба *Neurospora crassa* // Докл. АН СССР.— 1967.— 117, № 3.— С. 711—713.
2. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I / P. W. J. Rigby, M. Dieckman, C. Rhodes, P. Berg // J. Mol. Biol.— 1977.— 113, N 1.— P. 237.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
4. Тарантул В. Э., Гольцов В. А., Кузнецова Е. Д. Структурная организация генома эукариот // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1982.— С. 22.— (Молекуляр. биология; Т. 19).
5. Krumlauf R., Mauzluft G. A. Characterization of the sequence complexity and organization of the *Neurospora crassa* genome // Biochemistry.— 1979.— 18, N 19.— P. 3705—3713.
6. Timberlake W. E. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans* // Science.— 1978.— 202, N 4371.— P. 973—975.
7. Lauer G. D., Roberts T. M., Klotz L. C. Determination of nuclear DNA content of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Mol. Biol.— 1977.— 114, N 4.— P. 507—526.
8. Арипджанов Ш. А., Турсунов Х. Структура ДНК и устойчивость хлопчатника к вертициллезному вилту // Структура и функции нуклеиновых кислот и биосинтез белка в растениях: Тез. докл. II Всесоюз. симпоз.— Пушкино, 1977.— С. 5.

Ин-т биоорг. химии АН УзССР, Ташкент

Получено 07.08.87