

8 Ehling-Schulz M., Svensson B., Guinebretiere M.-E., Lindba T., Andersson M., Schulz A., Fricker M. et al. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains // *Microbiol.*, 2005. 151: 183-197.

9 Ботина С.Г., Пиксасова О.В., Цыганков Ю.Д., Суходолец В.В. Генетическое разнообразие природных штаммов бактерий вида *Streptococcus thermophilus*. *Генетика*, 2007. 5: 601-608.

Тұжырым

Bacillus штамдарының ДНКсы RAPD әдісімен зерттелді. Зерттеу нәтижесінде аталмыш штамдардың туыстық қатынасын анықтайтын мәліметтер алынды.

Summary

Testing of DNA of *Bacillus* strains – destructors of petroleum was performed by RAPD method, and the data was obtained regarding their genetic relationship.

УДК 579.06: 577.21

Аширбеков¹ Е.Е., Аbugалиева¹ Г.К., Балмуханов¹ Т.С., Айтхожина¹ Н.А.,

Цзю² В.Л., Игнатова² Л.В., Мукашева² Т.Д.

RAPD-АНАЛИЗ ДНК ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КАЗАХСКИХ НАЦИОНАЛЬНЫХ КИСЛОМОЛОЧНЫХ НАПИТКОВ

(¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина,

² Казахский государственный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)

Проведение RAPD-анализа ДНК микроорганизмов продуцентов казахских национальных молочных напитков - кумыса и шубата, позволило уточнить систематическое положение некоторых лабораторных культур дрожжей.

Дрожжи, принадлежащие к родам *Kluyveromyces* и *Saccharomyces*, являются продуцентами биологически активных веществ, используются в биотехнологии и в производстве казахских национальных кисломолочных продуктов. Многообразие существующих дрожжей, фенотипические различия жизненных форм, делают, в некоторых случаях, сложным точное определение их систематического положения, в связи, с чем таксономический статус определенных представителей данных родов подвергался пересмотру. В настоящее время возможности традиционной классификации, основанные на фенотипических и биохимических различиях, обогатились молекулярно-генетическими методами, главными из которых является сиквенирование генома и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Анализ молекулярно-генетических маркеров при помощи различных модификаций метода ПЦР позволяет достоверно описывать не только межвидовые и внутривидовые различия, но и дифференцировать между собой природные изоляты, детально описывать промышленные штаммы (связывая генетические маркеры с хозяйственно-ценными признаками), а также создавать генетические паспорта. В предлагаемой работе использован один из вариантов ПЦР - метод определения полиморфизма амплифицированных фрагментов (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) для изучения генетических связей штаммов, выделенных из казахских национальных напитков – кумыса и шубата. Систематическое положение отдельных представителей дрожжей родов *Kluyveromyces* и *Saccharomyces* до настоящего времени продолжает оставаться предметом обсуждения. Детальная идентификация микроорганизмов на основе объединения фенотипических, биохимических и молекулярно-генетических маркеров важна как для уточнения их систематического положения, так и для рационального использования ценных свойств данных микроорганизмов в биотехнологических процессах.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использованы 10 штаммов молочнокислых дрожжей из коллекции культур микроорганизмов КазНУ, выделенных из кумыса и шубата: *Kluyveromyces sphaerica* 3M, *K. sphaerica* KM95, *K. sp.* R59, *Saccharomyces sp.* 42K(P), *S. sp.* 71D, *S. sp.* 44KP, *S. sp.* 14K, *S. sp.* 5K, *S. sp.* 35U и *Candida kefyr var. kumis* 17. Образцы 3M, R59, 42K(P), 71D, 44KP выделены из шубата в Алматинской, Джамбульской и Кызылординской областях в 2001 и 2002 годах. Штаммы KM95 и *C. kefyr var. kumis* 17 выделены из кумыса в Алматинской области в 1995 и 1983 годах, соответственно.

Выделение и очистка ДНК выполнены с использованием набора «AxyPrepGenomic DNA Miniprep Kit» фирмы «Ахуген» согласно протоколу фирмы-производителя.

Метод RAPD основан на определении различий длин фрагментов ДНК, синтезированных в результате ПЦР с использованием произвольно отобранных олигонуклеотидных праймеров [1, 2]. Использованы 13 праймеров, нуклеотидные последовательности которых приведены в таблице 1.

Таблица 1 – RAPD-праймеры, использованные в работе

Номер праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
1	ACCCGGTCAC
2	GATGACCGCC
3	TGGACCGGTG
4	TGCCGAGCTG

5	TGCAGCGTGG
6	TGATCCCTGG
7	CTGCTGGGAC
8	GTAGACCGT
9	CCTTGACGCA
10	TTCCCCCGCT
11	AGGGAACGAG
12	GGACCCTTAC
13	GAGGGTGGCGGTTCT

Общий объем амплификационной смеси составлял 20 мкл и содержал 8 нг ДНК тестируемого образца, 8 пМ праймера, по 200мкМ каждого из 4-х дНТФ, 2,5 мМ MgCl₂, 1.5 ед Taq-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск) в рекомендованном производителем буфере. Амплификацию ДНК проводили в следующем режиме: денатурация при 95°C в течение 3 мин, 40 циклов амплификации при 94°C - 1 мин, 37°C (для праймера №13 - 55°C) - 30 с, 72°C - 40 с, с финальной элонгацией при 72°C в течение 3 мин.

Продукты RAPD-ПЦР анализировали методом электрофореза в 8% полиакриламидном геле. Пробы ДНК окрашивали бромистым этидием, визуализировали в УФ-свете и фиксировали в цифровом формате при помощи гель-документирующей системы «Gel-Doc» фирмы «BioRad». Определение длин фрагментов производили путем сравнения их с маркерами молекулярной массы «100 bp ladder DNA marker» (100-3000 пн) фирмы «Ахугеп». Первичная обработка и сравнительный анализ полученных паттернов, а также определение длин фрагментов проводилось с использованием программного обеспечения «Quantity One - 4.4.0».

Для оценки степени полиморфизма и уровня дивергенции между изученными штаммами полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков. В данной матрице наличие или отсутствие в спектре одинаковых по размеру фрагментов рассматривается, соответственно, как состояние «1» или «0». При построении матрицы учитывали фрагменты, воспроизводимые в эксперименте не менее двух раз. Различия по интенсивности свечения полос не учитывались. По матрице бинарных признаков были рассчитаны матрицы различий и построены дендрограммы сходства невзвешенным парно-групповым методом с арифметическим усреднением UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) с оценкой статистической поддержки узлов методом бутстрепа с помощью компьютерной программы Treecopw 3.1 [3]. Расчет генетической дистанции проводили по формуле:

$$GD_{XY} = 1 - \frac{2N_{XY}}{N_X + N_Y},$$

где GD_{XY} – генетическое расстояние по Nei и Li (1979) [4], N_X – число фрагментов в спектре X, N_Y – число фрагментов в спектре Y, N_{XY} – число общих фрагментов.

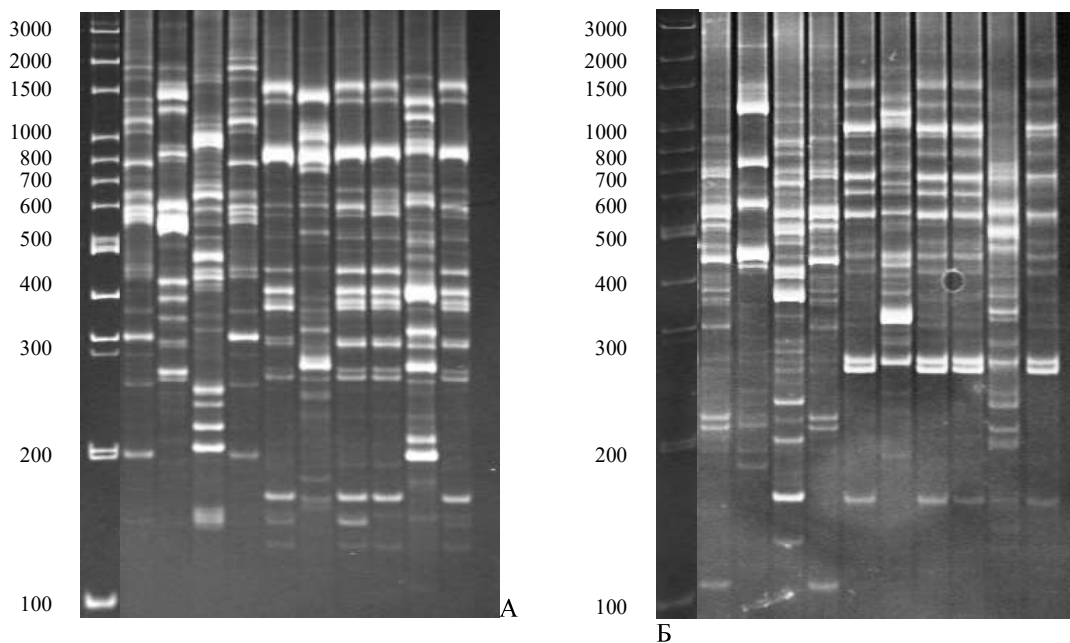
Результаты и их обсуждение

Систематическое положение дрожжей рода *Kluyveromyces* и *Saccharomyces*, их родовой и видовой статус в процессе их изучения неоднократно подвергались пересмотру. Дрожжи рода *Kluyveromyces*, первоначально отнесенные к роду *Saccharomyces*, позднее были включены в состав родов *Zygosaccharomyces*, *Fabospora*, *Zygofabospora* и других. В настоящее время, на основании мультигенного филогенетического анализа была проведена ревизия клада *Saccharomyces* и консервация рода *Kluyveromyces*, в котором, оставлены только шесть видов - четыре гибридизирующих вида *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. wickerhamii* и таксономически близкие им виды *K. aestuarii*, *K. nonfermentas* (Kurtzman, 2003) [5].

Сложности в классификации аскомицетов обусловлены, в частности, тем, что в их процессе развития сосуществуют две жизненные формы, различающиеся по фенотипу - анаморфа и телиоморфа. Исследованный в работе штамм *S. kefir var. kumis* 17 является анаморфой *Kluyveromyces marxianus*, что, в свое время и создало проблемы, связанные с его систематизацией [6].

п.н. М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

п.н. М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



М – маркер молекулярной массы, 1 – *C. kefir var. kumis* 17, 2 – *K. sphaerica* KM95, 3 – *K. sphaerica* 3M, 4 – *K. sp.* R59, 5 – *S. sp.* 42K(P), 6 – *S. sp.* 5K, 7 – *S. sp.* 14K, 8 – *S. sp.* 44KP, 9 – *S. sp.* 71D, 10 – *S. sp.* 35U.

Рисунок 1 – RAPD-спектры 10 штаммов молочнокислых дрожжей, изученных в работе с праймером №1 (А) и с праймером №13(Б)

В настоящей работе метод RAPD использован для характеристики десяти хозяйственно-ценных штаммов молочнокислых дрожжей, выделенных из казахских кисломолочных напитков – кумыса и шубата. Метод RAPD основан на ПЦР с одиночными десятичленными праймерами, для которых характерно преобладание в их составе G/C парами нуклеотидов и низкие температуры отжига. Число и расположение сайтов связывания таких неспецифических праймеров различаются среди микроорганизмов, относящихся не только к разным видам, но и к штаммам. В результате электрофоретического анализа амплификатов образуются специфические комбинации полос, так называемые, паттерны, которые служат достоверными «дактилоскопическими» характеристиками изучаемых штаммов. Преимуществами метода являются относительно невысокая, по сравнению с секвенированием, стоимость, достаточно высокая разрешающая способность. Метод оперативен, не требует информации о первичной последовательности ДНК, больших количеств исследуемого материала, что определяет его широкое использование при идентификации и паспортизации генетически немаркированных природных изолятов и промышленных штаммов [7].

Первоначально нами было проведено тестирование 13 произвольных праймеров с целью определения возможности их использования для дифференциации исследуемых штаммов (рис. 1).

При использовании праймеров №2, 6, 7, 8, 9, 10 какие-либо продукты не синтезировались. Использование в реакции остальных праймеров приводило к образованию большого количества фрагментов различной молекулярной массы и интенсивности, среди которых можно было выделить RAPD-маркеры, пригодные для идентификации определенного образца

В настоящее время с целью стандартизации данных, полученных в результате различных исследований, в качестве праймерной последовательности используются тандемные повторы фага M13, которые встречаются в геноме различных бактерий [8]. Этот праймер, обозначаемый в литературе как M13 использован в данной работе под номером 13. Использование данного праймера оказалось полезным при изучении степени генетической близости и молочнокислых дрожжей из казахских национальных напитков.

Дендрограмма родственных взаимоотношений, построенная на основе статистического анализа данных RAPD, демонстрирует уровень полиморфизма изучаемых образцов (рис. 2).

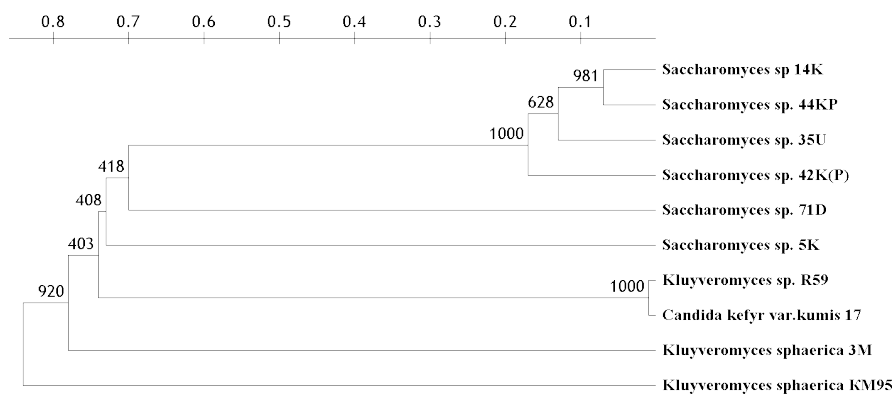


Рисунок 2 – Дендрограмма родственных взаимоотношений изученных штаммов молочнокислых дрожжей, построенная методом UPGMA на основе данных RAPD-анализа. Вверху расположена шкала генетических дистанций. В узлах дендрограммы приведены значения бутстрепа.

ПЦР ДНК двух штаммов *C. kefir var. kumis* 17 и *K. sp. R59* со всеми использованными праймерами приводила к образованию практически идентичных паттернов. Полученный результат свидетельствует либо о том, что штаммы являются двумя очень близкими, либо - одним и тем же штаммом. Следует отметить, что тестируемые штаммы выделены из разных источников: штамм *K. sp. R59* выделен из шубата, а штамм *C. kefir var. kumis* 17 выделен из кумыса.

Учитывая то, что *C. kefir var. kumis* является анаморфой *K. marxianus*, можно предположить, что штамм *K. sp. R59* с неопределенной до настоящего времени видовой принадлежностью, относится к виду *K. marxianus*.

Четыре штамма *S. sp. 44KP*, *S. sp. 14K*, *S. sp. 5K* и *S. sp. 35U* демонстрировали высокую схожесть ПЦР-фингерпринтов, свидетельствующую об их близком родстве. Идентифицировать данные штаммы можно лишь по наличию немногочисленных различающихся фрагментов малой интенсивности. На дендрограмме родственных взаимоотношений четыре близкородственных штамма 44KP, 14K, 5K и 35U образуют субкластер внутри большого кластера с индексом бутстрепа, определяющего статистическую достоверность выделения группы, равным 100 %. Полученные результаты позволяют утверждать, что указанные четыре штамма принадлежат к одному виду. Целью дальнейших исследований должно стать уточнение видовой принадлежности штаммов 44KP, 14K, 5K и 35U.

Штаммы KM95 и 3M, охарактеризованные ранее по фенотипическим признакам как *K. sphaerica*, не подтвердили принадлежность к одному виду по результатам RAPD-анализа. На полученной дендрограмме наиболее обособленно расположен штамм KM95, который образует отдельный кластер. Все остальные исследованные штаммы, включая и штамм 3M, объединены в другом кластере с высоким индексом бутстрепа 92,0 %.

Впервые проведен RAPD-анализ дрожжей, выделенных из двух национальных казахских кисломолочных напитков. Степень близости штаммов 44KP, 14K, 5K и 35U, отраженная на дендрограмме, предполагает их принадлежность к одному виду. Идентичность RAPD-паттернов штамма *K. sp. R59* и штамма *C. kefir var. kumis* 17 также демонстрируют высокую степень их генетической близости. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что штамм не определенной ранее видовой принадлежности *K. sp. R59* относится к *Kluveromyces marxianus*. Штаммы KM95 и 3M, отнесенные ранее к *Kluveromyces sphaerica*, по результатам RAPD-анализа не подтвердили принадлежность к одному виду. Продемонстрирована целесообразность использования метода RAPD для уточнения систематического положения различных штаммов и генетического мониторинга ценных биопродуцентов.

Литература

- 1 Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski A., Tingey S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Res.*, 1990. 22: 6531-6535.
- 2 Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Research*, 1990. 24: 7213-7218.
- 3 <http://bioc-www.uia.ac.be/u/yvdp/treeconw.html>.
- 4 Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979. 76: 5269-5273.
- 5 Kurtzman C.P., Robnett C.J. Phylogenetic relationships among yeasts of the *Saccharomyces* complex determined from multigene sequence analyses // *FEMS Yeast Res.*, 2003. 3:417-432.
- 6 Елинов Н.П. Некоторые преодолимые проблемы для медицинских микологов // *Проблемы медицинской микологии*, 2010. 1: 3-9.
- 7 Xufre A., Simoes F., Girio F., Clemente A., Amaral-Collaco T. Use of RAPD Analysis for Differentiation among Six Ecological *Saccharomyces* spp. Strains // *Food technol. biotechnol.*, 2000. 38: 53-58

8 Huey B., Hall J. Hypervariable DNA Fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite Probe from Bacteriophage M13 // *J. Bacteriol.*, 1989. 5: 2528-2532.

Тұжырым

Қазақтың ұлттық кымыз және шұбат сусындарын алуда қатысатын сүтқышкылды ашытқы продуценттерінің ДНҚ-ларының RAPD анализі бұрынғы сипатталмаған кейбір ашытқы дақылдарының систематикалық орындарың анықтауға мүмкіндік берді.

Summary

RAPD-analysis of DNA of microorganisms-producers of Kazakh national milk beverages, kumiss and shoubat, had allowed to specify the systematic position of some previously undefined laboratory cultures of yeasts.

**Бишимбаева Н.К., Ертаева Б.Е., Амирова А.К.,
Шаяхметова И.Ш., Гусейнов И.Р., Умбетаев И.И., Рахимбаев И.Р.
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПЫЛЬЦЫ
ХЛОПЧАТНИКА КАЗАХСТАНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ**

(Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы,
Институт хлопководства МСХ РК, г. Атакент, Казахстан)

Оптимизирован способ получения трансгенных растений отечественного хлопчатника при помощи метода агробактериальной трансформации пыльцы. Получены трансгенные растения хлопчатника с. Мактаарал 4005 с встроенными репортерным GUS- геном и селективным маркерным nptII- геном.

Хлопчатник (*Gossypium hirsutum* L.) является важнейшей технической культурой, широко распространен и выращивается в промышленных масштабах как в средней полосе, так и в тропиках в более, чем 50 странах по всему миру. Площади, занятые этой культурой, встречаются в Америке, Австралии, Китае, Индии и на Ближнем Востоке, где климатические условия соответствуют естественным для произрастания этих видов, включая периоды жаркой сухой погоды, и где существуют адекватные условия влажности, часто поддерживаемые с помощью ирригации [1]. Более того, хлопковое волокно не только покрывает потребности текстильной промышленности нашей страны, но и является основой экспорта, наряду с экспортом нефти, зерна и цветных металлов [2]. Культивируемый на полях хлопчатник подвержен абиотическим стрессам, нападением насекомых, вирусному и грибному заражению. Для получения трансгенного хлопчатника с коммерчески ценными признаками был использован, в основном, метод агробактериальной трансформации [3, 4]. В качестве реципиентных систем для генетической трансформации хлопчатника обычно используют различные экспланты – семядоли и гипокотили [5, 6, 7], апексы побегов [8], пыльца [9], эмбрионные каллусные ткани [10]. Отмечено, что агробактериальная трансформация с использованием пыльцы позволяет избежать зависимости от генотипа, занимает мало времени и решает проблему соматической изменчивости. В целом, трансформация хлопчатника развивалась медленно по сравнению с другими сельскохозяйственными культурами. Проблемы, связанные с зависимостью процессов регенерации растений от генотипа ограничивали использование хозяйственно ценных сортов хлопчатника.

Целью данного исследования является оптимизация способа агробактериальной трансформации пыльцы для сорта хлопчатника Мактаарал-4005 казахстанской селекции.

Объекты и методы

Объектом исследования служил районированный сорт хлопчатника казахстанской селекции - Мактаарал-4005.

Агробактериальную трансформацию пыльцы проводили по протоколу Li et al. [9], модифицированному нами для сорта Мактаарал-4005. Цветки хлопчатника опыляли пыльцой, трансформированной суспензией *Agrobacterium tumefaciens*, содержащей плазмиду с репортерным геном глюкоксидазы (*GUS*-ген) и селективным маркерным геном (*nptII*).

Определение экспрессии репортерного *GUS*- гена проводили при помощи метода гистохимического окрашивания растительных эксплантатов по Jefferson с соавторами [11] с использованием реактива *X-gluc*. Геномную ДНК выделяли по СТАБ методу [12]. ДНК разделяли в 1% агарозном геле, проявляли этидиум бромидом и анализировали при помощи геле-документирующей системы “Biorad”. Идентификацию встраивания *nptII*- и *GUS*-генов в геном тестируемых растений проводили методом ПЦР на амплификаторе “Eppendorf Personal”.

Результаты и их обсуждение

Агробактериальная трансформация хлопчатника при помощи пыльцы. Проведена агробактериальная трансформация хлопчатника при помощи трансформированной пыльцы. Пыльцу трансформировали при помощи агробактерии, содержащей плазмиду с *GUS*- и *npt II*- генами, и опыляли ей предварительно кастрированные цветки. В результате из 140 опыленных таким образом цветков было получено 19 коробочек, из которых получено 600 семян. Растения из этих семян выращивали в торфяных горшках и пересаживали в грунт (рисунок 1).