

Н. А. ШАНННА, А. Л. МАЗИН, М. В. ПАХОМОВА, Г. Н. ЗАЙЦЕВА

ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК ФИТОФЛАГЕЛЛЯТ *ASTASIA LONGA* И *EUGLENA GRACILIS*

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 25 X 1972)

Проблема филогенетических взаимоотношений пигментированных фотосинтезирующих форм одноклеточных организмов и их бесцветных аналогов интересна как сама по себе, так и с точки зрения биогенеза хлоропластов.

Известно, что под действием некоторых факторов наблюдается обесцвечивание клеток *Euglena gracilis* (¹, ²). Получены бесцветные штаммы, у которых отсутствуют хлоропласты и пигменты (³). Основываясь на способности *E. gracilis* к обесцвечиванию, Принцгейм (⁴) предположил, что из нее могла возникнуть бесцветная форма *Astasia longa*. Однако автор отмечает, что эта природная бесцветная форма не идентична экспериментально полученным обесцвеченным штаммам *E. gracilis*. Действительно, более глубокое сравнительное изучение обесцвеченного стрептомицином штамма *E. gracilis* и *A. longa* привело Блюма с сотрудниками (⁴) к выводу, что число и значимость морфологических, физиологических и биохимических различий между этими двумя организмами заставляет отнести их к разным родам. Эти авторы, не отрицая родства *Astasia* и *Euglena*, ставят, однако, под сомнение, что *E. gracilis* могла быть наследственной формой для *A. longa*.

Одним из важнейших критериев филогенетического родства организмов является первичная структура ДНК. Кирас и Чанг (⁵) показали, что ядерные ДНК в клетках *E. gracilis* и *A. longa* имеют одинаковую плавающую плотность в CsCl, что может свидетельствовать о сходстве их нуклеотидного состава. Минорный компонент ДНК, соответствующий хлоропластной ДНК *E. gracilis*, не был найден у *A. longa*.

Настоящая работа посвящена подробному анализу общеклеточной ДНК *A. longa* и *E. gracilis*. Для исследований использовали один штамм *A. longa* J. (Институт океанографии, Калифорния, США) и три штамма *E. gracilis*: № 511 Klebs из Кембриджа, № 514 Klebs из Праги, № 518 var. *bacillaris* Klebs клон Р из Праги (музей водорослей Ботанического института Ленинградского государственного университета). Клетки *E. gracilis* выращивали на свету (⁶), а *A. longa* — в темноте (⁷). Для выделения ДНК клетки после выращивания промывали физиологическим раствором и суспендировали в равном объеме среды А: 0,15 М NaCl; 0,015 М питрат натрия; 0,1 М ЭДТА; 0,2 М трис-HCl, pH 8,5. Суспензию клеток разрушали в гомогенизаторе со стеклянными бусами (⁸). В гомогенат добавляли 20% раствор дезоксихолата натрия до конечной концентрации 2% и суспендировали 30 мин. с последующим доведением концентрации NaCl до 1 М. Все перечисленные операции вели при 0—4°. Первую депротеинизацию ДНК проводили фенолом pH 8,3, последующие — смесью хлороформ:изоамиловый спирт (24:1). ДНК очищали, используя приемы, рекомендованные для растительных тканей (⁸).

Полученные препараты ДНК содержали не более 1% белка и РНК, обладали температурным гиперхромизмом около 25—27% и молекулярным весом порядка 5—6 · 10⁶ дальтона ($S_{20,w} = 14—15S$).

Для определения нуклеотидного состава препараты ДНК гидролизовали до азотистых оснований (72% HClO_4 , 100°, 60 мин.), которые разделяли с помощью хроматографии на бумаге в кислом растворителе Кирби⁽⁹⁾. Отделение 6-метиламинопурина (МАП) и 5-метилцитозина (МЦ) от других оснований, их идентификацию и расчет количественного содержания проводили, как описано ранее⁽¹⁰⁾. Количество МАП и МЦ определяли только после рехроматографии в соответствующих растворителях.

Гидролиз ДНК до пиримидиновых фрагментов состава пиримидин- Φ_{n+1} , разделение смесей олигонуклеотидов по длине, определение количественного состава разных изоплитов и вычисление параметров полиномиальных уравнений делали согласно методикам^(11, 12).

Таблица 1

Нуклеотидный состав ДНК трех штаммов *E. gracilis* и *A. longa*

Источник ДНК	Основания в ДНК, мол. % *				Пур Пир	Г + Т А + Ц
	Г	Ц	А	Т		
<i>Euglena gracilis</i> 511	25,18±0,31	25,59±0,46	25,11±0,84	24,12±0,67	1,01	0,97
<i>Euglena gracilis</i> 514	24,98±0,19	25,17±0,26	25,03±0,56	24,82±0,48	1,00	0,99
<i>Euglena gracilis</i> 518	25,00±0,21	25,20±0,20	25,18±0,51	24,62±0,47	1,00	0,98
<i>Astasia longa</i>	24,18±0,60	24,37±0,31	25,78±0,51	25,67±0,49	1,00	0,99

* Среднее из 8—14 определений.

Результаты по изучению нуклеотидного состава ДНК разных штаммов *E. gracilis* и *A. longa* представлены в табл. 1. Как следует из приведенных данных, ДНК трех исследованных штаммов *E. gracilis* имеют практически одинаковый состав оснований, весьма сходный с нуклеотидным составом ДНК *A. longa*. Оба организма характеризуются эквимолярным соотношением нуклеотидов в ДНК. Уместно отметить, что присутствие около 1,5% ДНК хлоропластов у *E. gracilis*⁽¹³⁾ не сказывается на составе нуклеотидов общеклеточной ДНК.

Наши данные по составу оснований ДНК *E. gracilis* хорошо согласуются с результатами Бравермана с сотрудниками⁽¹⁴⁾. В ДНК *E. gracilis* (штамм Z) помимо 4 основных азотистых оснований был обнаружен МЦ (в количестве 2,3 мол. %), который концентрируется в ДНК ядра⁽¹³⁾.

Таблица 2

Содержание оснований в ДНК эвгленовых флагеллят (мол. %)

Минорные основания	<i>Euglena gracilis</i> 511	<i>Euglena gracilis</i> 514	<i>Euglena gracilis</i> 518	<i>Astasia longa</i>
5-МЦ	2,09 (3)	2,24 (7)	2,71 (6)	0,97 (3)
6-МАП	0,21 (2)	0,28 (2)	0,26 (2)	0,12 (2)

Примечание. В скобках — число параллельных определений.

Данные по содержанию метилированных оснований в ДНК изучаемых фитофлагеллят представлены в табл. 2. Мы установили, что ДНК *E. gracilis*, кроме МЦ, содержит также МАП. Следует отметить, что содержание МЦ в ДНК *E. gracilis* превышает содержание МАП почти в 10 раз. Три исследованных штамма *E. gracilis* по количественному содержанию МАП почти не различаются. Однако можно с достоверностью считать,

Таблица 3

Содержание пиримидиновых изоплитов в ДНК *Euglena gracilis* и *Astasia longa*

Источник ДНК	Изоплиты в ДНК, мол.% *								$\beta + \delta$
	моно-	ци-	три-	тетра-	пента-	гекса-	гепта *	высшие	
<i>Euglena gracilis</i> 514	11,72 $\pm$ 0,36	10,71 $\pm$ 0,13	7,38 $\pm$ 0,04	5,88 $\pm$ 0,18	4,21 $\pm$ 0,12	2,76 $\pm$ 0,16	2,12 $\pm$ 0,06	4,62 $\pm$ 0,11	1,90 $\pm$ 0,08
<i>Astasia longa</i>	12,40 $\pm$ 0,12	10,65 $\pm$ 0,27	7,83 $\pm$ 0,32	5,91 $\pm$ 0,02	4,02 $\pm$ 0,16	3,17 $\pm$ 0,16	2,0	6,62 $\pm$ 0,33	1,94 $\pm$ 0,05

* Среднее из 3 опытов

Таблица 4

Коэффициенты полинома 5-й степени

Источник ДНК	α	β	γ	δ	ϵ	ζ
<i>Euglena gracilis</i> 514	3,55 $\pm$ 0,23 *	17,03 $\pm$ 0,77	-11,72 $\pm$ 0,53	3,26 $\pm$ 0,29	-0,43 $\pm$ 0,07	0,02 $\pm$ 0,00
<i>Astasia longa</i>	3,53 $\pm$ 0,19	20,20 $\pm$ 0,89	-15,53 $\pm$ 0,68	4,87 $\pm$ 0,31	-0,71 $\pm$ 0,11	0,04 $\pm$ 0,00

* Стандартная ошибка.

что штамм № 518 содержит несколько больше МЦ, чем два других штамма.

Интересно, что целый ряд систематиков выделяют этот штамм, как особую разновидность *E. gracilis*, которая несколько отличается от типовой формы по своей морфологии (²).

Следует отметить, что содержание метилированных оснований в ДНК *A. longa* почти в два с лишним раза меньше, чем в ДНК *E. gracilis*. Следовательно, при сходстве общего нуклеотидного состава ДНК *Astasia* и *Euglena* обнаруживают заметное различие в содержании минорных оснований, особенно МЦ.

В препаратах ДНК*, выделенных из *E. gracilis* (штамм № 514) и *A. longa*, была изучена частота встречаемости пиримидиновых последовательностей разной длины. Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что ДНК *E. gracilis* и *A. longa* достоверно не отличаются друг от друга по характеру распределения пиримидиновых изоплитов и относятся к одному и тому же типу с показателем сблоченности $\beta \sim 1,90$, свойственному для ДНК некоторых низших растений (¹⁵). Как было показано ранее (¹²), зависимость между количеством отдельных изоплитов и их длиной в ДНК различных организмов имеет весьма индивидуальный характер и достаточно точно выражается соответствующим полиномом 5-й степени. Вычисление параметров полиномиальных уравнений, соответствующих распределению пиримидиновых изоплитов в ДНК *E. gracilis* и *A. longa*, показало, что они практически одинаковы (табл. 4). Это может свидетельствовать о подобии характера нуклеотидной последовательности ДНК у этих двух видов.

Таким образом, сравнительное изучение ДНК *E. gracilis* и *A. longa* наряду с изучением физико-химических свойств их цитоплазматических рибосом (⁶) показывает, что морфологическое и физиологическое сходство этих организмов имеет глубокую молекулярную основу. Это подтверждает точку зрения Принцгейма (¹) о близком родстве *Astasia* и *Euglena*. Однако различие в степени метилирования ДНК указывает на то, что геномы этих организмов не полностью идентичны.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
2 IX 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. G. Pringsheim, In: *Farblose Algen*, Stuttgart, 1963, S. 180, 189. ² Т. Г. Попова, В кн. *Флора споровых растений СССР*, 8, в. 1, «Наука», 1966, стр. 30, 264. ³ M. Edelman, J. R. Schiff, H. T. Epstein, *J. Mol. Biol.*, 11, 769 (1965). ⁴ J. J. Blum, J. R. Sommer, V. Kahn, *J. Protozool.*, 12, 202 (1965). ⁵ F. J. Kieras, K. S. Chiang, *Exp. Cell. Res.*, 64, 89 (1971). ⁶ Н. А. Шанина, Г. Н. Зайцева и др., *Биохимия*, 38, в. 6 (1973). ⁷ М. В. Пахомова, Н. А. Шанина, Г. Н. Зайцева, *Микробиология*, 34, 953 (1970). ⁸ Г. Е. Сулимова, А. Г. Слюсаренко, В кн. *Строение ДНК и положение организмов в системе*, М., 1972, стр. 19. ⁹ Б. Ф. Ванюшин, В кн. *Современные методы в биохимии*, 1, М., 1964, стр. 236. ¹⁰ М. В. Пахомова, Г. Н. Зайцева, А. Н. Белозерский, *ДАН*, 182, 712 (1968). ¹¹ А. Л. Мазин, Б. Ф. Ванюшин, *Биохимия*, 32, 377 (1967). ¹² А. Л. Мазин, *Молекул. биол.*, 6, 542 (1972). ¹³ G. Brawerman, J. M. Eisenstadt, *Biochim. et biophys. acta*, 91, 477 (1964). ¹⁴ G. Brawerman, D. A. Hufnagel, E. Chargaff, *Biochim. et biophys. acta*, 61, 340 (1962). ¹⁵ В. А. Гусейнов, А. Л. Мазин и др., *Биохимия*, 37, 381 (1971).

* Выделенные препараты ДНК оказались вполне представительными и по нуклеотидному составу не отличались от суммарной ДНК клеток, анализированной по методу Шмидта и Тангаузера (⁹).