



УДК 577.21:582.951.4

Е. В. Ковтун, Ю. Ю. Глеба

КЛОНИРОВАНИЕ, ОТБОР И ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ *NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA*

Два повтора — *rNpl.9* и *rNpl.18* — были отобраны из клоноутки *N. plumbaginifolia*. Полученные последовательности относятся к разным типам: *rNpl.9* — кластеризованный повтор, а *rNpl.18* — разбросан по геному. Характеристика повторов основана на результатах блот-гибридизации и рестриктового анализа. Показана видоспецифичность выделенных повторов по отношению к геному *N. sylvestris*. Последовательности могут использоваться для анализа гибридов в роде *Nicotiana* и установления филогенетических связей растений этого рода.

Введение. Повторяющиеся последовательности — наиболее вариабельная часть ядерного генома. Благодаря этому они являются удобными молекулярными маркерами для изучения эволюции растительного генома и дивергенции видов. Кроме того, видоспецифические повторы незаменимы для анализа гибридов.

Метод анализа соматических гибридов с помощью видоспецифических повторяющихся последовательностей предложили Саул и Потрикус [1]. Использование повторов по сравнению с другими ядерными молекулярно-генетическими маркерами имеет ряд следующих преимуществ.

1. В силу высокой копииности и разбросанности по геному повторяющиеся последовательности дают информацию сразу о многих генетических локусах.

2. Используя видоспецифические диспергированные последовательности, можно показать количественный вклад по ядерной ДНК каждого партнера в гибридном растении [2—4]. Это обстоятельство делает их особенно удобными для анализа асимметричных соматических гибридов.

3. Являясь генетически нестабильной частью ядерного генома, повторяющиеся последовательности могут служить индикатором стрессовых воздействий на растительную ДНК, каковыми являются длительное культивирование, отдаленная гибридизация и жесткое облучение [5, 6].

Цель настоящей работы состояла в выделении фрагментов ядерной ДНК, содержащих видоспецифические повторяющиеся последовательности *N. plumbaginifolia*, и характеристике их организации в геноме. В дальнейшем эти повторы использовали для анализа асимметричных соматических гибридов *N. plumbaginifolia* × *N. sylvestris* (см. статью Коросташ и др. в этом же номере).

Материалы и методы. Для клонирования ДНК *N. plumbaginifolia* экстрагировали из листьев по методике Шуэ и др. [7]. Выделенную ДНК подвергали дальнейшей очистке при центрифугировании в градиенте плотности CsCl с бромистым этидием при 16 °С в течение 36 ч. Растительную ДНК, гидролизованную *HindIII* и *EcoRI*, лигировали с

© Е. В. КОВТУН, Ю. Ю. ГЛЕБА, 1991

pUC19, гидролизованной теми же ферментами. Штамм *TGI E. coli* трансформировали лигазной смесью [8].

Клоны, содержащие повторяющиеся последовательности, были отобраны при гибридизации с общей ДНК *N. plumbaginifolia*, меченной ^{32}P . Для гибридизации колонии *E. coli* лизировали и фиксировали на нитроцеллюлозных фильтрах [9]. Гибридизацию с ^{32}P -меченной общей ДНК *N. plumbaginifolia* проводили в течение 16 ч при 65 °С в 10×растворе Денхарта, содержащем 2×SSC, 0,1 % DS-Na и 100 мкг/мл денатурированной ДНК цыпленка. Фильтры отмывали 2 раза по 2 ч в 2×SSC и 0,1 % DS-Na при 65 °С.

Плазмидную ДНК выделяли по стандартному методу щелочного лизиса [10]. Вставки растительной ДНК выщепляли соответствующи-

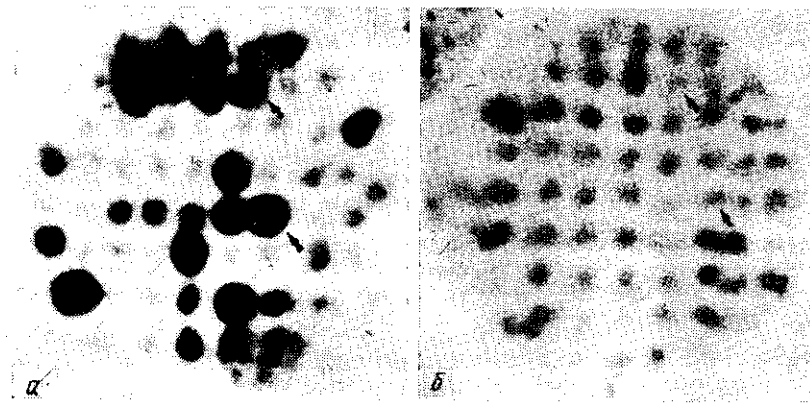


Рис. 1

ми ферментами из рекомбинантных плазмид и выделяли при адсорбции на ДЭАЭ-бумагу после электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле [11]. Метка [^{32}P]dCTP [10] в ДНК пробы была введена реакцией ник-трансляции [10].

Для блот-гибридизации растительная ДНК была полностью гидролизована рестриктазами *BamHI*, *EcoRI* *HindIII* в соответствии с рекомендациями поставщика (НПО «Фермент», Вильнюс). Каждая проба содержала 5 мкг ДНК и 15—20 единиц фермента. Рестриктные фрагменты разделяли при горизонтальном электрофорезе в 0,8 %-ном агарозном геле. В качестве маркера молекулярной массы использовали фрагменты ДНК фага λ , полученные при расщеплении *PstI*. Перенос на нейлоновые фильтры проводили по методу Саузерна [12].

Блот-гибридизацию гидролизованной общей ДНК с мечеными фрагментами из рекомбинантных плазмид выполняли в буфере, содержащем 500 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,5, 7 % DS-Na и 1 мМ ЭДТА. Фильтры отмывали в 100 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,5, 1 мМ ЭДТА и 1 % DS-Na.

Результаты и обсуждение. Для получения фрагментов ДНК, содержащих повторяющиеся последовательности, на основе *pUC19* была создана частичная клонотека *N. plumbaginifolia*, включающая 300 рекомбинантных клонов. Повторяющиеся последовательности были отобраны при гибридизации колоний в жестких условиях с меченной ^{32}P ДНК *N. plumbaginifolia* (рис. 1, а). Повторная гибридизация клонов с ^{32}P -меченной ДНК *N. sylvestris* выявила видоспецифические повторы (рис. 1, б). Для дальнейшей работы были отобраны два повтора — *pNpl.9* и *pNpl.18* (на рис. 1 указаны стрелками).

Рестриктная карта вставки *pNpl.9* изображена на рис. 2 (размер фрагментов приведен в тыс. п. о.). Вставка имела сайты узнавания для *EcoRI* и *BamHI*.

В качестве зондов для гибридизации с общей ДНК *N. plumbaginifolia* и *N. sylvestris* использовали фрагмент вставки, выщепляемый *EcoRI*, размером 2,1 тыс. п. о. Гибридизация с общей ДНК *N. plumba-*

ginifolia, гидролизованной *BamHI*, дала полосы размером 6,5; 6,0; 3,6; 2,3; 1,9; 1,4; 0,7 тыс. п. о. (рис. 3, а, 1). При расщеплении *HindIII* гибридизационные полосы были локализованы в верхней части трека (трек 3). Подобный тип гибридизации характерен для повторов, локализуемых на немногих фрагментах генома, то есть кластеризованных повторов.

Вставка рекомбинантной плазмиды *pNpl.18* имела длину 1090 п. о. Ферментный анализ растительного фрагмента не выявил сайтов для рестриктаз, узнающих 6 п. о.: *BamHI*, *PstI*, *KpnI*, *XbaI*, *Sall*, *BglI*. Однако *Sau3A* разбивает вставку на последовательности длиной 530, 330, 110, 70, 50 п. о.



Рис. 2

Фрагмент плазмиды *pNpl.18*, несущий вставку растительной ДНК, гибридизовали с гидролизатом ДНК *N. plumbaginifolia* (рис. 3, б) по *BamHI* (2), *BamHI* и *EcoRI* (3), *BamHI* и *HindIII* (4). Характерно наличие гибридизационного пятна по всему треку, что указывает на хороший разброс по ядерному геному данной последовательности [1]. Однако имеются и некоторые различия. Так, полное расщепление ДНК по *BamHI* на фоне интенсивного гибридизационного пятна не дает никаких дискретных полос. А в случае комбинации ферментов *EcoRI* и *BamHI* можно различить гибридизационные полосы размером 3,8; 3,0; 1,6; 1,2; 0,9; 0,4 тыс. п. о. Для *HindIII* и *BamHI* выделяется полоса 2,3 тыс. п. о. и также имеются полосы размером 1,8; 1,6; 1,45 и 1,2 тыс. п. о. (см. рис. 3, б). Смещение гибридизационного пятна к началу трека у гидролизата по *BamHI* может объясняться отсутствием сайтов узнавания фермента на самом повторе. Исходя из этого можно предположить, что клонированная последовательность хорошо разбросана, однако существуют отдельные места на геноме, где повтор концентрируется в большей степени (например, полоса 2,3 тыс. п. о., выщепляемая *HindIII*).

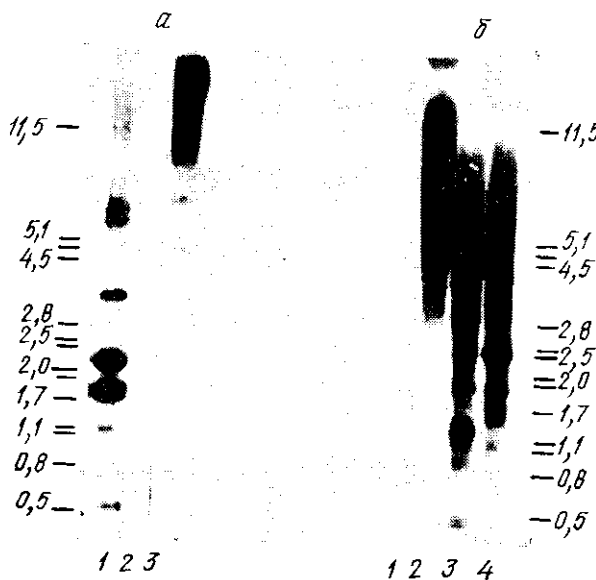


Рис. 3

pNpl.9 и *pNpl.18* давали чрезвычайно слабый сигнал при блот-гибридизации с общей ДНК *N. sylvestris*. Поэтому мы сочли возможным использовать их для анализа соматических гибридов *N. plumbaginifolia* × *N. sylvestris* (Коросташ и др.) (рис. 3, а, 2 и рис. 3, б, 1).

Таким образом, выделены и частично охарактеризованы два повтора *N. plumbaginifolia*. Отобранные последовательности по характеру гибридизации с гидролизатами ядерной ДНК отличаются от прежде полученных повторов *N. plumbaginifolia* [13] и не имеют гомологии с повтором *pNp21* [4]. Выделенные нами повторяющиеся последовательности относятся к разным типам: *pNpl.9* — кластеризованный повтор, а *pNpl.18* — разбросан по геному. *pNpl.9* и *pNpl.18* обладают высокой степенью видоспецифичности по отношению к геному *N. sylvestris*. По общепринятой классификации *N. plumbaginifolia* и *N. sylvestris* принадлежат к одной секции *Alatae* рода *Nicotiana* [14]. Однако наши

результаты, а также итоги блот-гибридизации с другими повторами *N. plumbaginifolia* [4, 13] указывают на относительно отдаленное филогенетическое расстояние между этими видами.

Резюме

Из частковой клонотеки *N. plumbaginifolia* відібрано два клони, що містять послідовності, які повторюються. Виходячи з результатів блот-гібридизації, *pNpl.9* включає вставку із кластерованим повтором. Послідовності, гомологічні *pNpl.18*, розкидані по геному *N. plumbaginifolia*. Проведено рестриктивний аналіз виділених послідовностей, що повторюються. Повтори мають високу ступінь видоспецифічності і можуть бути використані для дослідження гібридів роду *Nicotiana*.

Summary

Two clones containing repetitive sequences were selected from partial library of *N. plumbaginifolia*. The *pNpl.9* clone includes the insert with a clustered repeat. The sequences homologous to *pNpl.18* are dispersed throughout *N. plumbaginifolia* genome. The restriction analysis of isolated repetitive sequences was performed. The *pNpl.9* and *pNpl.18* clones are characterized by high degree of species-specificity and can be used for analysis of hybrids in *Nicotiana* genus.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saut M. W., Potrykus I. Species-specific repetitive DNA used to identify interspecific hybrids // Plant Cell Rep.—1984.—3, N 1.—P. 65—67.
2. Imamura J., Saut M. W., Potrykus I. X-ray irradiation promoted asymmetric somatic hybridization and molecular analysis of the products // Theor. and Appl. Genet.—1987.—74, N 4.—P. 445—450.
3. Muller-Gensert E., Schieder O. Interspecific T-DNA transfer through plant protoplast fusion // Mol. and Gen. Genet.—1987.—208, N 1/2.—P. 235—241.
4. Piastuch W. C., Bates G. W. Chromosomal analysis of *Nicotiana* asymmetric somatic hybrids by dot blotting and in situ hybridization // Ibid.—1990.—222, N 1.—P. 97—103.
5. Nuclear DNA amplification in cultured cells of *Oryza sativa* L. / K. L. Zheng, S. Castiglione, M. G. Biasini et al. // Theor. and Appl. Genet.—1987.—74, N 1.—P. 65—70.
6. Анализ геномов гибридов *Hordeum* × *Secale* / С. К. Свиташев, А. В. Вершинин, Л. А. Першина и др. // Докл. АН СССР.—1988.—298, № 2.—С. 483—486.
7. Shure M., Wessler S., Fedoroff N. Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize // Cell.—1983.—35, N 1.—P. 225—233.
8. Aung C., Hiller R. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells // Nucl. Acids Res.—1988.—16, N 6.—P. 3225.
9. Grinstein N., Hordness D. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1975.—72.—P. 3691—3695.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.—479 с.
11. Banner D. B. Recovery of DNA fragments from gels by transfer to DEAE-paper in electrophoresis chamber // Anal. Biochem.—1982.—125, N 1.—P. 139—142.
12. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.—1975.—98, N 1.—P. 509—518.
13. Seeckaert F., Jacobs M. Study of the divergence of moderately repetitive sequences in *Nicotiana* species and in protoclones of *Nicotiana plumbaginifolia* Viviane // Theor. and Appl. Genet.—1988.—75, N 5.—P. 746—750.
14. Goodspeed T. N. The genus *Nicotiana* // Chronica Botanica.—Waltham, 1954.—P. 283—314.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91