

7. Ochi K., Zhang D., Kawamoto S., Hesketh A. Molecular and functional analysis of the ribosomal L11 and S12 protein genes (rplK and rpsL) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Mol Gen Genet.* – 1997. – 5, N 256. – P. 488–498.
8. Чернов В.М., Гоголев Ю.В., Мухаметшина Н.Е., Нестерова Т.Н., Чернова О.А. Особенности амплификации нуклеотидных последовательностей оперонов *trnA* и *trnB* *Acholeplasma laidlawii* PG8 // *Вестник биотехнологии и физ.-хим. биологии.* – 2006. – 2, N 3. – С. 5–13.
9. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/Microbial Genomes/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/Microbial%20Genomes/)
10. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTN 2.2.29 \(megablast, bl2seq\)/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTN%202.2.29%20(megablast,%20bl2seq)/)
11. Смирнов А.В., Энтелис Н.С., Крашенинников И.А., Мартэнс Р., Тарасов И.А. Особенности структуры 5S рРНК, ее взаимодействие с макромолекулами и возможные функции // *Успехи современной биохимической науки.* – 2008. – 48. – С. 133–180.

POLISHCHUK L.V., MATSELUKH B.P.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnoho str., 154, e-mail: LVPolishchk@ukr.net

rRNA-GENES OF ACTINOMYCETES, WHICH ARE GOMOLOGOUS TO *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2 rRNA-CLUSTER

Aims. To study the spread of the rRNA-genes homologous fo analogous genes of *S. globisporus* 1912-2 in the genomes of actinomycetes. **Methods.** The program BLASTN 2.2.29 was used for in silico analysis of Internet base of dates NCBI (Microbial genomes). **Results.** Sequence gomologous on 82–99 % to sequences of rRNA-genes of *S. globisporus* 1912-2, were detected in 100 actinomycetes strains from 28 different families. The greatest number of strains belonging to some families: *Streptomycetaceae* (17 species), *Mycobacteriaceae* (10 species), *Micrococcaceae* (10 species), *Pseudonocardiaceae* (9 species), *Nocardiaceae* (8 species), *Micromonosporaceae* (8 species). The majority of families (14 spesies) included only one such strain actinomycetes. Sequences homologous to the 5S rRNA-gene of *S. globisporus* 1912-2 were detected in chromosomes of 25 actinomycetes cultures. **Conclusions.** In silico analysis of the primary structures of rRNA-gene clusters in the genomes of 100 actinomycetes revealed the existence of the largest differences in structures and spreading of 5S rRNA-genes in the studied cultures.

Key words: rRNA, identity, *Actinomycetes*, chromosome, *Streptomyces globisporus* 1912-2.

УДК [575.22 : 582.542.11] (292.3)

ТВАРДОВСЬКА М.О.¹, АНДРЕЄВ І.О.¹, АМОСОВА А.В.², СПІРІДОНОВА К.В.¹, НАВРОЦЬКА Д.О.¹, САМАТАДЗЕ Т.Е.², ЗОЩУК С.А.², МУРАВЕНКО О.В.², КУНАХ В.А.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: twardovska06@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,

Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32, e-mail: atomar@mail.ru

ВИВЧЕННЯ ГЕНОМІВ РОСЛИН *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. З РІЗНИХ ЛОКАЛІТЕТІВ ПРИБЕРЕЖНОЇ АНТАРКТИКИ ЗА ДОПОМОГОЮ ХРОМОСОМНИХ ТА МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

Судинні рослини регіону Прибережної Антарктики представлені лише двома видами: щучником антарктичним (*Deschampsia antarctica* Desv.) та колобантусом Кіто (*Colobanthus quitensis* Kunth. Bartl.). Питання виключного поширення в Антарктиці тільки двох видів судинних рослин і досі залишається невирішеним. *D. antarctica* викликає науковий інтерес завдяки ряду фізіологічних ознак, що забезпечують її виживання у суворох умовах

Антарктики, серед яких короткий вегетаційний період та здатність до вегетації і цвітіння за низьких температур, що, зокрема, пов'язано із високим рівнем фотосинтезу за цих умов; можливість існування в умовах високого рівня ультрафіолетового опромінення; стійкість до світлового стресу; пристосування до екстремально-сухих та надмірно зволжених ґрунтів та інше [1].

Відомо, що стресові фактори середовища

здатні підвищувати мінливість геному, що проявляється на цитогенетичному та молекулярно-генетичному рівнях у появі В-хромосом, анеу- та поліплоїдії, структурних перебудовах хромосом, а також у змінах послідовності ДНК. Поряд із цим, у літературі обмежена кількість даних, які стосуються дослідження числа хромосом та формули каріотипу *D. antarctica* [2, 3]. Хромосомний поліморфізм у каріотипах *D. antarctica* з території Прибережної Антарктики до цих пір не вивчений. Тому метою даної роботи є проведення молекулярно-цитогенетичного аналізу рослин *D. antarctica* з різних локалітетів Прибережної Антарктики.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом для досліджень слугувало насіння *D. antarctica*, зібране в 2005–2008 рр. під час експедицій на Аргентинських островах (о-ви Дарбо та Галіндез). Отримання асептичних проростків та вирощування рослин описано в роботі [4]. Отримані рослини культивували на агаризованому живильному середовищі Гамборга, Евелейга (B5) [5], доповненому 0,1 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти (НОК). Розмноження рослин проводили клонуванням шляхом поділу одержаних дернин на фрагменти.

Для цитогенетичного аналізу використали корінці проростків довжиною 0,8–1,5 см, які з метою накопичення та синхронізації мітозів перед фіксацією витримували у воді з льодом протягом 24 годин при температурі 3–4 °С або в 0,2%-му розчині колхіцину протягом 2 год при температурі 37 °С. Зразки фіксували в суміші етанол: льодяна оцтова кислота у співвідношенні 3:1 протягом 1 доби. Через добу фіксатор змінювали на свіжий. Зафіксований матеріал зберігали при -20 °С.

Для встановлення хромосомного числа виду зразки фарбували 1%-им ацетоорсеїном і виготовляли давлені препарати. У роботі використовували мікроскоп “NU-2E Carl Zeiss”. Мікрофотографування проводили фотоапаратом Canon 1000D. Отримані дані опрацьовували статистично [6].

Молекулярно-цитогенетичні дослідження проводили за допомогою С- та DAPI-диференційного забарвлення, флуорисцентної гібридизації *in situ* (FISH) з використанням в якості зондів 5S та 26S рДНК. Активність районів ядерцевих організаторів хромосом вивчали за методикою Ag-NOR-забарвлення. Аналіз метафазних пластинок проводили за

допомогою флуоресцентного мікроскопа Olympus BX61 з чорно-білою ПЗС камерою CoolSnap («Roper Scientific Inc», США). Хромосоми в каріотипах розмішували за розміром та центромерним індексом відповідно до цитологічних принципів [7].

ДНК виділяли цетавлоновим методом [8] з листових пластинок рослин, вирощуваних *in vitro*. Якість і концентрацію отриманої ДНК оцінювали за допомогою гель-електрофорезу, порівнянням інтенсивності флуоресценції рослинної ДНК із ДНК фага λ відомої концентрації в УФ-променях після забарвлення бромистим етидієм [9]. Молекулярно-генетичний аналіз проводили із застосуванням методу полімеразної ланцюгової реакції з вісьмома ISSR- та двома IRAP-праймерами.

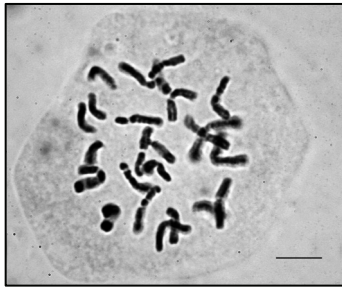
Результати та обговорення

Відомо, що види роду *Deschampsia* мають диплоїдний набір $2n = 26$, тобто основне хромосомне число $x = 13$. Однак, є види з основним хромосомним числом $x = 7$ (*D. artropurpurea* ($2n = 14$), *D. flexuosa* (зазвичай $2n=28$), яке іноді використовують як один із критеріїв для їх виділення в окремі роди [3, 10, 11]. Окрім цього, відомі поліплоїдні та триплоїдні генотипи, які мають 52 та 39 хромосом відповідно [12].

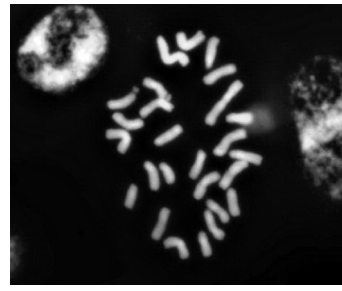
Каріологічний аналіз рослин *D. antarctica* з двох локалітетів Прибережної Антарктики (о-ви Дарбо та Галіндез) виявив у каріотипах 13 пар ($2n = 26$) хромосом, розміром близько 3–10 мкм (рис.). Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників, які встановили для рослин цього виду такий самий диплоїдний набір ($2n = 26$) [2, 3].

Окрім цього, у каріотипах рослин з о. Дарбо, поряд із 26 хромосомами основного набору (А-хромосомами), вперше виявлено від 1 до 3 мікрохромосом (В-хромосом). При цьому не виявлено варіабельності за числом хромосом основного набору.

Результати каріологічного аналізу рослин *D. antarctica*, отриманих із насіння, зібраного на аргентинській антарктичній станції «Джубані» (о. Кінг Джордж), показали, що усі вони мали диплоїдний набір $2n = 26$ [3]. Поряд із цим, у деяких проростках знайдено клітини з $2n = 28$. Таке число хромосом дослідники пояснюють присутністю у каріотипі двох додаткових хромосом, які відповідають 1-й та 11-й хромосомам, що вказує на подвійну трисомію. Мікспоїдію виявлено у п'яти із 14 рослин *D. antarctica*.



a



б

Рис. Метафазні пластинки у клітинах апікальної меристеми корінців проростків *D. antarctica*, які містять 26 хромосом: а – забарвлення ацетоорсеїном, б – забарвлення DAPI. Довжина відрізка становить 10 мкм

Автори припускають, що це може бути пов'язано з вирощуванням виду в умовах (зокрема, температурних), які сильно відрізняються від природних у місцях зростання, а також не виключають той факт, що хромосомна нестабільність є невід'ємною характеристикою роду [3]. Загалом, гаплоїдний набір каріотипу *D. antarctica* складається із 5 метацентричних, 3 субметацентричних, 4 субтелоцентричних та 1 телоцентричної хромосоми. Ядерцевий організатор міститься на кінці 1-ої пари субметацентричних хромосом, яка була гетероморфною у кількох вивчених клітинах за рахунок невеликого перегрупування гетерохроматинових блоків [3].

Згідно гіпотези Кавано і Альбертса поліплоїдні види роду *Deschampsia* виникли внаслідок дуплікацій ($x = 7-14$), водночас види з хромосомним числом $2n=26$ виникли внаслідок диспloidії (28–26) від поліплоїдних видів [13, 14]. Деякі автори вважають, що *D. antarctica* – один із видів, еволюція якого йшла в напрямку диспloidії [3].

Цитогенетичний аналіз вторинних корінців *D. antarctica* з островів Галіндез, Пітерман, Берселот виявив широкий розмах мінливості за числом хромосом від 10 до 68. Також було знайдено полісоматію (міксоплоїдію) [15].

Рисунок С-диференційного забарвлення хромосом *D. antarctica* відноситься до «прицентромерно-теломерного» типу з невеликими інтеркалярними бендами. Хромосоми у каріотипах рослин з різних локалітетів несуттєво відрізнялися за числом та розміром інтеркалярних і теломерних С-бендів, але у рослин з о. Дарбо прицентромерні бенди на хромосомах були більшого розміру. Також виявлено поліморфізм за розмірами С-бендів, що прилягають до ядерце-утворювальних ділянок хромосом, які мають супутники.

Додаткові хромосоми інтенсивно

фарбувалися при С-диференційному забарвленні хромосом і зберігали конденсовану темнозабарвлену структуру в інтерфазних ядрах, що характерно для В-хромосом. Очевидно, виявлені мікрохромосоми можна віднести до В-хромосом, які являють собою додаткові до основного хромосомного набору генетичні елементи з автономним способом успадкування. Зазвичай В-хромосоми сильно конденсовані, гетерохроматинізовані, менші за розміром, порівняно з А-хромосомами, та їх число в каріотипі може значно варіювати (від 1 до кількох десятків) [16, 17]. В-хромосоми виявлені в каріотипах багатьох рослин, в тому числі і у близькоспоріднених видів *D. caespitosa* $2n = 26(0-2B)$ та *D. wibeliana* $2n = 26(0-5B)$ [1].

Рисунок DAPI-забарвлення метафазних хромосом був подібним до С-бендінгу. Ідентифікацію хромосом в каріотипах проводили за рисунками С- та DAPI-бендінгу з урахуванням морфології, а також розташування молекулярних маркерів – сайтів рибосомних генів.

FISH-аналіз виявив 10 сайтів 5S рДНК на п'яти парах хромосом А-набору. Окрім того, послідовності 5S рДНК було виявлено також на деяких В-хромосомах. У каріотипах вивчених зразків сигнали 5S рДНК розташовані в проксимальних районах довгих плечей хромосом, у субтеломерних районах коротких плечей хромосом, а також у центральній частині деяких В-хромосом. Такі результати показують, що у каріотипах рослин з о. Дарбо є, щонайменше, два типи В-хромосом. В термінальних районах коротких плечей двох пар субметацентричних хромосом знайдено великі сайти локалізації 26S рДНК. На одній парі хромосом розташована чітко виражена вторинна перетяжка, і виявлений у цій ділянці сайт локалізації 26S рДНК має більший розмір порівняно із другою парою хромосом, на якій вторинна перетяжка практично не виражена.

В інтерфазних ядрах виявлено чотири (два великих і два середнього розміру) Ag-забарвлених ядерця, що вказує на наявність двох транскрипційно активних ядерце-утворювальних ділянок.

Дослідження хромосом *D. antarctica* з Прибережної Антарктики (о-ви Дарбо та Галіндез) з використанням молекулярно-цитогенетичних маркерів, дозволило встановити, що в каріотипах цих рослин є 2 хромосоми із супутниками, а не одна, як вважалося раніше [3]. При цьому, обидві ядерце-утворювальні хромосоми несуть транскрипційно активні рибосомні гени.

Вважається, що наявність у каріотипі В-хромосом, а також збільшення у хромосомах кількості гетерохроматину та числа активних ядерце-утворювальних ділянок пов'язані із адаптивними особливостями виду. Очевидно, рослини *D. antarctica* з о. Дарбо більшою мірою зазнають дії екстремальних умов середовища.

Було проведено також молекулярно-генетичний аналіз охарактеризованих вище на цитологічному рівні рослин *D. antarctica* з островів Дарбо та Галіндез. Для цього використали 8 ISSR- та 2 IRAP-праймерів, для яких раніше було встановлено, що вони виявляють поліморфізм у популяціях цього виду з Прибережної Антарктики. Загалом було враховано 134 ПЛР-продукти в діапазоні від 0,3 до 2,5 т.п.н., з яких 14 виявилися поліморфними. Генетична відстань за Жаккардом між зразками, розрахована на основі даних ПЛР-аналізу, становить 0,116. Це значення знаходиться в

межах діапазону генетичних дистанцій (0,017–0,234), які було визначено для вибірки з 23 рослин *D. antarctica*, зібраних з островів Аргентинського архіпелагу та навколишніх островів (дані не наведено).

Висновки

Встановлено хромосомне число $2n = 26$ для рослин *D. antarctica* з двох локалітетів Прибережної Антарктики (о-ви Дарбо та Галіндез). Вперше виявлено у каріотипах рослин з о. Дарбо, поряд із 26 хромосомами основного набору, від 1 до 3 додаткових хромосом. Використання хромосомних та молекулярних маркерів для аналізу каріотипів рослин *D. antarctica* дозволило виявити поліморфізм за рисунками С- та DAPI-диференційного забарвлення хромосом і наявність двох транскрипційно активних ядерце-утворювальних ділянок хромосом. Молекулярно-генетичний аналіз із застосуванням поліморфних ISSR-маркерів показав, що відмінності між дослідженими зразками не виходять за межі внутрішньопопуляційного поліморфізму, властивого рослинам із досліджуваного регіону.

Роботу виконано за часткової фінансової підтримки Національного антарктичного наукового центру Держкомінформнауки в рамках проекту № Н/13-2013 «Дослідження взаємозалежностей показників адаптивності антарктичних рослин в природі та модельних умовах як елемент оцінки впливу кліматичних змін на структуру і функції суходільних екосистем Антарктики».

Література

1. Parnikoza I., Kozeretska I., Kunakh V. Vascular plants of the Maritime Antarctic: origin and adaptation // American Journal of Plant Sciences – 2011. – 2, N 3 – P. 381–395.
2. Moore D.M. Chromosome numbers of Falkland Islands angiosperms // British Antarctic Survey Bulletin – 1967. – № 14. – P. 69–82.
3. Cardone S., Sawatani P., Rush P., Gargna A.M., Poggio L., Schrauf G. Karyological studies in *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) // Polar Biol. – 2008. – 32, N 3. – P. 427–433.
4. Загричук О.М., Дробик Н.М., Козерецька І.А., Парнікоза І.Ю., Кунах В.А. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) з двох районів Прибережної Антарктики // Український антарктичний журнал. – 2011/2012. – № 10–11. – С. 289–295.
5. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – 46, N 5. – P. 417–421.
6. Плохинский Н.А. Биометрия. Издание 2-е. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
7. Levan A, Fredga K, Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // Hereditas. – 1964. – 52. – P. 201–222.
8. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. – 1985. – 5. – P. 69–76.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
10. Крогулевич Р.Е., Ростовцева Т.С. Хромосомные числа цветковых растений Сибири и Дальнего Востока. – Новосибирск: Наука, 1984. – 286 с.

11. Chiapella J. A molecular phylogenetic study of *Deschampsia* (Poaceae: Avenae) inferred from nuclear ITS and plastid trnL sequence data: support for recognition of *Avenella* and *Vahlodea* // *Taxon*. – 2007. – 56, N 1. – P. 55–64.
12. Alberts F. Vergleichende Karyologie der Gräser-Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* (Poaceae–Aveneae) // *Plant Syst. Evol.* – 1980. – 136. – P. 137–167.
13. Kawano S. Cytogeography and evolution of the *Deschampsia caespitosa* complex // *Can. J. Bot.* – 1963. – 41. – P. 719–742.
14. Alberts F. Kariologische und genomatische Veränderungen innerhalb der Gräser Subtriben *Aristaveninae* und *Airinae* // *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* – 1978. – 91. – P. 693–697.
15. Adonin V.I., Parnikova I.Yu., Kyrychenko S.S., Kozeretska I.A., Kunakh V.A. Mixoploidy in *Deschampsia antarctica* of the Maritime Antarctic // *Матеріали читань присвячених 300-річчю з дня народження К. Ліннея*. – Луганськ: Елтон-2, 2007. – С. 74.
16. Camacho J.P.M., Sharbel T.F., Beukeboom L.W. В chromosome evolution // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 2000. – 355. – P. 163–178.
17. Кунах В.А. Додаткові або В-хромосоми рослин. Походження і біологічне значення // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2010. – 8, № 1. – С. 99–139.

TWARDOVSKA M.O.¹, **ANDREEV I.O.**¹, **AMOSOVA A.V.**², **SPIRIDONOVA K.V.**¹,
NAVROTSKA D.O.¹, **SAMATADZE T.E.**², **ZOSCHUK S.A.**², **MURAVENKO O.V.**²,
KUNAKH V.A.¹

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: twardovska06@mail.ru*

² *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Russia, 119991, Moscow, Vavilov str., 32, e-mail: amomar@mail.ru*

STUDY OF GENOMES IN DESCHAMPSIA ANTARCTICA DESV. FROM DIFFERENT LOCALITIES OF MARITIME ANTARCTIC USING CHROMOSOMAL AND MOLECULAR MARKERS

Aims. To perform molecular cytogenetic analysis of *D. antarctica* plants from different localities of maritime Antarctic. **Methods.** Cytogenetic analysis, C-banding, DAPI-banding, fluorescent *in situ* hybridization, silver-staining technique for nucleolar organizer regions, PCR-analysis. **Results.** Chromosome number 2n = 26 was determined in *D. antarctica* plants from two localities of Maritime Antarctic (Darboux and Galindez Islands). Karyotypes of plants from Darboux Island were found to contain from 1 to 3 supernumerary chromosomes. FISH-analysis revealed 10 5S rDNA loci found on five A-chromosome pairs, as well as additional loci were localized on some of the B-chromosomes. Large 26S rDNA loci were located in the terminal positions on short arms of two submetacentric chromosome pairs. Genetic analysis of the plants was performed using polymorphic ISSR- and IRAP-markers. Jaccard genetic distance between the *D. antarctica* accessions under study was calculated from the data of PCR-analysis and compared to the data of assessment of *D. antarctica* genetic variability in the region. **Conclusions.** Using chromosomal and molecular markers in analysis of *D. antarctica* karyotype we succeeded in revealing C-banding and DAPI-banding polymorphism. Furthermore, two transcriptionally active nucleolar organizer regions were identified. Molecular genetic analysis using polymorphic ISSR-markers demonstrated that genetic differences between the accessions under study fell in a range of within population variation that was found for the plants from investigated region.

Key words: *D. antarctica*, karyotype, chromosome markers, genetic variation.