

В.М. МЕЛЬНИК¹, І.О. АНДРЕЄВ¹,
К.В. СПІРІДОНОВА¹, Н.М. СТРАШНЮК²,
В.А. КУНАХ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Київ, вул. Академіка Заболотного, 150,
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

² Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка
Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2

ЗМІНИ 18S-25S рДНК У КУЛЬТУРІ ТКАНИН ДЕЯКИХ ВИДІВ ТИРЛИЧІВ *GENTIANA L.*



Методом блот-гібридизації досліджено 18S-25S рДНК інтактних рослин та культури тканин *G. acaulis*, *G. punctata* і *G. lutea*. У калюсних тканинах встановлено зменшення кількості повторів рибосомної ДНК порівняно з рослинами. Для *G. lutea*, на відміну від інших видів, виявлено внутрігеномну гетерогенність генів рРНК, а також якісні зміни рДНК у культурі тканин, зокрема появу змінених повторів. Припускається існування зв'язку між особливостями структури генів рРНК та їхніми перебудовами в культурі *in vitro*.

© В.М. МЕЛЬНИК, І.О. АНДРЕЄВ, К.В. СПІРІДОНОВА,
Н.М. СТРАШНЮК, В.А. КУНАХ, 2007

Вступ. Гени 18S-25S рибосомних РНК рослин представлені численними копіями, розмішеними в одному або кількох локусах геному у вигляді блоку тандемних повторів. Різні зони повтору рДНК істотно відрізняються за швидкістю молекулярної еволюції. Найконсервативнішими є кодувальні ділянки генів 18S-25S рРНК. Порівняно з ними нетранскрибований міжгенний спейсер (НТС) характеризується значно більшим рівнем мінливості. За розміром НТС, як правило, більший за транскрибовану область, і його довжина варіює в різних живих організмів [1, 2]. Особливості рДНК — багатокопійність, кластерна організація, наявність в її складі ділянок які відрізняються за швидкістю еволюції, а також механізмів, що забезпечують узгоджену еволюцію повторів рДНК всередині кластера, роблять її зручною моделлю для з'ясування питань еволюції геному.

Культивування рослинних клітин в умовах *in vitro* може супроводжуватись різноманітними змінами геному, які проявляються у вигляді транслокацій, делецій, точкових мутацій, змін копійності окремих послідовностей ДНК та ін. Особливості перебудов геному залежать від багатьох чинників, серед яких важливе місце займають властивості вихідного генотипу [3, 4]. У зв'язку з високою швидкістю геномних змін культура *in vitro* представляє інтерес як потенційний модельний об'єкт для дослідження еволюції геному. Подальше вивчення особливостей геномної мінливості в культурі рослинних тканин актуальне в зв'язку з усе ширшим застосуванням культури *in vitro* не лише у фундаментальних дослідженнях, але й у практичних біотехнологіях.

У даній роботі представлено результати дослідження генів 18S-25S рРНК в рослинах та культурі тканин *in vitro* трьох представників роду *Gentiana L.*: *G. acaulis*, *G. lutea* і *G. punctata*. Вибір об'єктів дослідження обумовлений значенням тирличів як цінної лікарської сировини, а також реальною загрозою їх зникнення та необхідністю охорони і відновлення чисельності.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були інтактні 4—5-річні рослини *G. lutea*, *G. punctata* (зібрані на г. Пожижевська, Чорногірський хребет Карпат), *G. acaulis* (г. Туркул, Чорногірський хребет Карпат), а також отримані з рослин цих популяцій калюсні тканини різно-

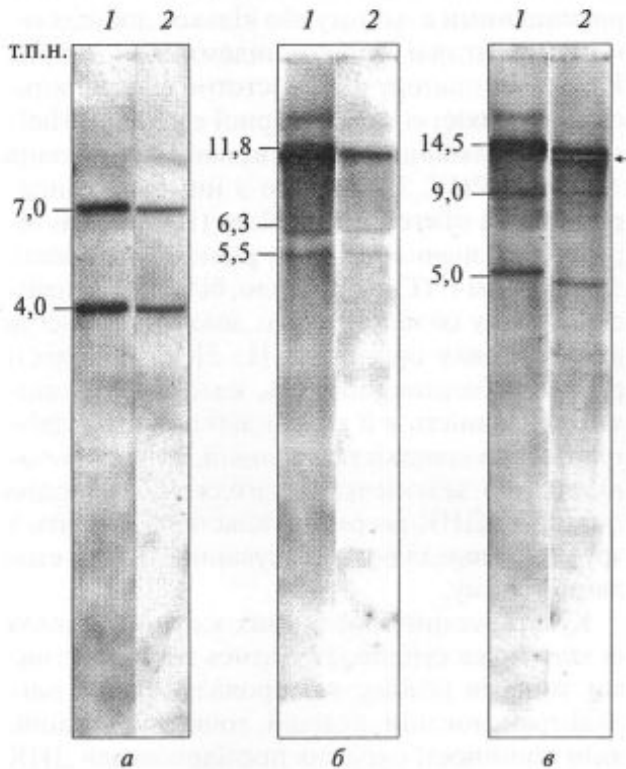


Рис. 1. Поліморфізм HindIII-продуктів гідролізу 18S-25S рДНК інтактних рослин та калюсних культур *G. acaulis* (а), *G. punctata* (б) і *G. lutea* (в): 1 — інтактна рослина (листок); 2 — калюсна культура. Стрілкою позначено фрагмент 18S-25S рДНК, властивий для калюсу *G. lutea*

го терміну вирощування в умовах *in vitro* на середовищі Мурасіге-Скуга з половинним вмістом макро- і мікросолей, доповненому 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) і 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) [5].

ДНК виділяли з молодих листків рослин та калюсів за методом [6]. Гідроліз ДНК проводили BamHI, EcoRI, HindIII ендонуклеазами рестрикції протягом 4 год згідно з інструкцією фірми-виробника («МВІ Fermentas», Литва). Продукти гідролізу розділяли за допомогою горизонтального гелі-електрофорезу в 1%-ному агарозному («Serva», США) гелі в 0,5 × TAE буфері при градієнті напруги 2 В/см протягом 12 год. Перенос ДНК на нейлонову мембрану здійснювали методом капілярного переносу за Саузерном [7].

У ролі зонда для блот-гібридизації використовували повний ядерний рибосомний ген гороху (плазмідна конструкція рНА1) [8]. Зонд

мітили α [³²P]-dCTP методом розсіяної затравки. Блот-гібридизацію проводили за методикою [7].

Результати досліджень та їх обговорення. Для дослідження 18S-25S рДНК тирличів у природі та в культурі *in vitro* використовували метод аналізу поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів, зокрема, проводили гібридизацію фракціонованих в агарозному гелі продуктів HindIII, BamHI та EcoRI рестрикційного гідролізу сумарної ДНК з міченою послідовністю повного повтору 18S-25S рДНК гороху. Аналіз перебудов у культивованих тканинах тирличів проводили шляхом порівняння з гібридизаційними спектрами рДНК листка інтактних рослин.

Після HindIII-гідролізу 18S-25S рДНК *G. acaulis* на радіоавтографі спостерігали фрагменти розміром 4,0 і 7,0 т.п.н. (рис. 1, а); *G. punctata* — 5,5; 6,3 і 11,8 т.п.н. (рис. 1, б); інтактної рослини *G. lutea* — 5,0 і 9,0 т.п.н. та групу фрагментів у діапазоні 13—14,5 т.п.н. (рис. 1, в). У *G. punctata* і *G. lutea* фрагменти розміром 11,8 та 13,0—14,5 т.п.н., відповідно утворені внаслідок розщеплення одного з HindIII-сайтів, представляють собою повний рибосомний повтор. Формування коротших фрагментів, представлених у меншій кількості, у цих видів відбувається після розщеплення обох HindIII-сайтів. Калюсні тканини *G. acaulis* і *G. punctata* за спектрами HindIII-фрагментів не відрізнялися від інтактної рослини. В калюсній культурі *G. lutea* виявлено відмінності від інтактної рослини за складом групи фрагментів у діапазоні 12,0—14,5 т.п.н., а також за фрагментами розміром 4,5—9,3 т.п.н. (рис. 1, в, дор. 2).

Рестриктазою BamHI послідовність 18S-25S рДНК тирличів розщеплюється з утворенням п'яти фрагментів, однакових за довжиною у всіх видів (0,6; 1,2; 2,6; 3,2 т.п.н.), та поліморфних у різних видів фрагментів, розмір яких складає 6,0 і 7,2 т.п.н. у *G. acaulis* (рис. 2, а); 6,8 і 8,0 т.п.н. у *G. punctata* (рис. 2, б). У *G. lutea* варіабельні фрагменти розташовані в зоні 8,0—9,5 т.п.н. у інтактної рослини та 7,0—9,5 т.п.н. у калюсної культури (рис. 2, в).

З результатів гідролізу 18S-25S рДНК рестриктазою EcoRI, представлених на рис. 3, видно, що досліджувана ділянка геному містить два сайти для даної ендонуклеази рестрикції, в

результаті розщеплення яких утворюються фрагменти: консервативний у всіх об'єктів довжиною 3,8 т.п.н. і варіабельний розміром 8,0 т.п.н. у *G. punctata* (рис. 3, а); від 9,0 до 10,5 т.п.н. у інтактної рослини *G. lutea* (рис. 3, б, дор. 1) і від 8,0 до 10,5 т.п.н. у калюсної культури цього ж виду (рис. 3, б, дор. 2, 3).

Таким чином, отримані результати демонструють відмінності вивчених видів за структурою генів 18S-25S рДНК. У *G. punctata* і *G. acaulis* гени рРНК представлені одним мажорним класом послідовностей, а в *G. lutea* у складі геному виявляється декілька різних за довжиною класів рибосомних повторів, про що свідчить наявність групи поліморфних фрагментів, характерних лише для цього виду.

Проведені дослідження показали подібність калюсних культур та інтактних рослин видів *G. punctata* і *G. acaulis* за наборами HindIII, BamHI, EcoRI рестрикційних фрагментів 18S-25S рДНК, що свідчить про відсутність істотних змін довжини рибосомних повторів у культивованих тканинах цих видів. Поряд з цим у *G. lutea* знайдено відмінності між спектрами рестрикційних фрагментів 18S-25S рДНК інтактної рослини і культивованих *in vitro* тканин. HindIII-гідроліз виявив у калюсі *G. lutea* окрім характерних для інтактної рослини послідовностей рДНК додатковий, менший за розміром, клас повторів довжиною ~ 12 т.п.н. (рис. 1, в). Крім того, калюс *G. lutea* відрізняється за розміром фрагментів рДНК, які утворюються при розщепленні обох HindIII-сайтів. BamHI- та EcoRI-гідроліз (рис. 2 і 3) також виявляють в культивованих тканинах *G. lutea* фрагменти 18S-25S рДНК (довжиною 7 і 8 т.п.н. відповідно), відсутні в спектрах інтактної рослини виду. Ці результати свідчать про те, що в культивованих тканинах *G. lutea* відбуваються геномні перебудови, які зачіпають повтори рибосомної ДНК і призводять до утворення нового класу повторів 18S-25S рДНК меншої порівняно з інтактною рослиною довжини.

В культивованих тканинах досліджених видів було виявлено також зміни копійності 18S-25S рДНК, а саме, зменшення кількості повторів 18S-25S рибосомної ДНК порівняно з геномами рослин (рис. 1—3). Порівняння культури тканин різних пасажів, зокрема *G. acaulis* —

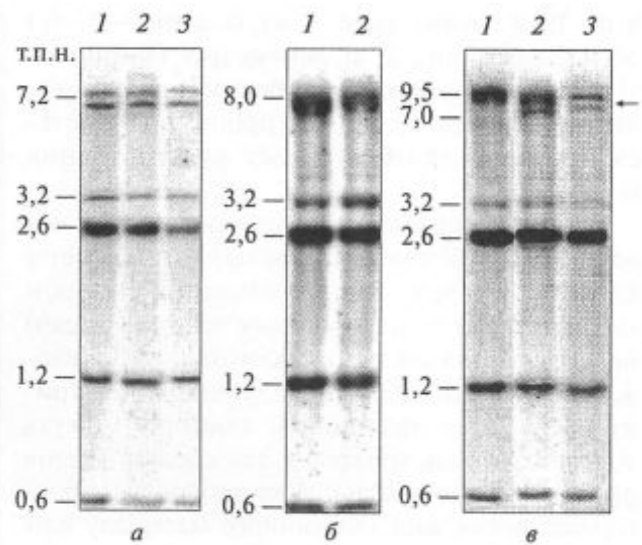


Рис. 2. Поліморфізм BamHI-продуктів гідролізу 18S-25S рДНК інтактних рослин та калюсних культур: а — *G. acaulis* (1 — листок, 2 — калюс, 6-й пасаж, 3 — калюс, 19-й пасаж), б — *G. punctata* (1 — листок, 2 — калюс, 6-й пасаж), в — *G. lutea* (1 — листок, 2 — калюс, 23-й пасаж, 3 — калюс, 50-й пасаж). Стрілкою позначено фрагмент 18S-25S рДНК, властивий для калюсу *G. lutea*

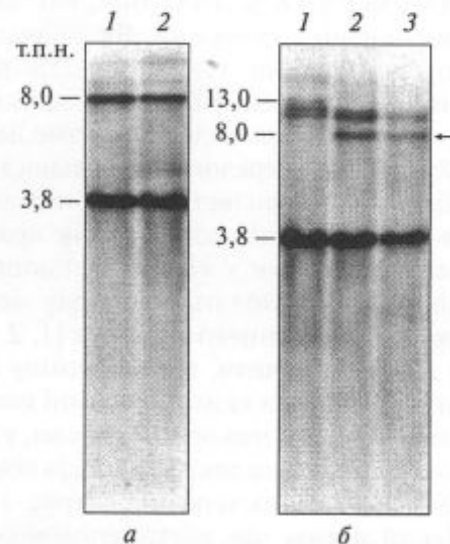


Рис. 3. Поліморфізм EcoRI-продуктів гідролізу 18S-25S рДНК інтактних рослин та калюсних культур: а — *G. punctata* (1 — листок, 2 — калюс, 6-й пасаж), б — *G. lutea* (1 — листок, 2 — калюс, 23-й пасаж, 3 — калюс, 50-й пасаж). Стрілкою позначено фрагмент 18S-25S рДНК, властивий для калюсу *G. lutea*

6-й і 19-й пасажи (рис. 2, а), *G. lutea* — 23-й і 50-й пасажи (рис. 2, в), демонструє відмінності між ними за кількістю рибосомних повторів, які свідчать про те, що цей процес відбувається протягом тривалого часу культивування *in vitro*.

Відносна кількість рДНК у геномі може корелювати з білоксинтезувальною здатністю клітин, але з врахуванням значної копійності (від кількох сотень до кількох десятків тисяч) переважна кількість рибосомних генів вважається функціонально надлишковою. Припускають, що надлишкові повтори можуть відігравати роль матеріалу для еволюції генів рРНК або виконувати структурну роль у просторовій організації генетичного матеріалу клітини [1, 9]. Можливо, що зменшення копійності рДНК, яке відбувається в культурі тканин досліджених видів, обумовлене спрощенням форми існування клітин порівняно з цілісним організмом інтактної рослини та відповідним зниженням потреб у білковому синтезі.

Отже, проведені дослідження не виявили в культурі тканин *G. punctata* і *G. acaulis* змін розміру повтору рибосомної ДНК та розташування сайтів використаних рестриктаз. У той же час у калюсних тканинах *G. lutea* частина повторів 18S-25S рДНК зазнала змін, які полягають у зменшенні їх довжини. Як свідчать результати картування генів 18S-25S рРНК тирличів [10], знайдені зміни зачіпають фрагменти, що містять ділянку НТС. Саме цей регіон найчастіше є джерелом варіабельності повтору рДНК, яка виявляється при порівнянні геномів багатьох видів рослин і, як правило, зумовлена варіаціями у кількості повторюваних одиниць, що входять до складу нетранскрибованого міжгенного спейсера [1, 2, 9].

Слід також зазначити, що на відміну від *G. punctata* і *G. acaulis*, в яких рибосомні повтори представлені одним мажорним класом, у геномі *G. lutea* виявляється декілька класів повторів 18S-25S рДНК, різних за розміром (рис. 1—3 та [10]). Такий зв'язок між внутрігеномною гетерогенністю рибосомних повторів і наявністю перебудов у культурі тканин схиляє до думки про особливу структурну організацію генів 18S-25S рРНК *G. lutea*, яка забезпечує більшу ймовірність появи та/або ампліфікації нового класу рибосомних повторів. Цілком вірогідно,

що це обумовлено існуванням у геномі даного виду кількох окремих кластерів рДНК, які містять повтори різної довжини. В ролі можливого механізму знайдених перебудов можна розглядати ампліфікацію нового класу повторів з укороченою ділянкою НТС, утвореного в межах одного з кластерів, або ж існуючого мінорного класу, який не виявляється за допомогою гібридизації в інтактній рослині. Отримані результати свідчать, що якісні зміни 18S-25S рДНК у калюсних тканинах *G. lutea* відбулися на початкових етапах (до 23-го пасажу) і в подальшому просто підтримувалися в культурі (до 50-го пасажу) (рис. 2, в та 3, б). Поряд з цим зменшення кількості 18S-25S рДНК в калюсних тканинах *G. acaulis*, *G. lutea* і *G. punctata* порівняно з інтактними рослинами спостерігали як на початкових, так і більш пізніх етапах культивування.

Таким чином, встановлено, що культивування тканин тирличів *G. acaulis*, *G. lutea* і *G. punctata* супроводжується поступовим зменшенням копійності генів 18S-25S рРНК. У калюсних культурах *G. acaulis* і *G. punctata* не виявлено помітних змін довжини рибосомних повторів та розташування сайтів пізнавання використаних рестриктаз. У культурі тканин *G. lutea* виявлено перебудови 18S-25S рДНК, які полягають у появі додаткового класу повторів меншого розміру. На відміну від двох інших, цей вид характеризується внутрігеномною гетерогенністю рибосомних повторів за довжиною. Отримані дані вказують на можливий зв'язок між особливостями структурної організації генів 18S-25S рРНК та ймовірністю їхніх перебудов в культурі *in vitro*.

Автори висловлюють подяку канд. біол. наук О.Г. Алхімовій (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України) за люб'язно надану плазмідну конструкцію з рДНК гороху. Роботу виконано за часткової фінансової підтримки наукової програми НАН України «Фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні основи функціонування живих систем і розробка принципів керування ними».

SUMMARY. 18S-25S rDNA of intact plants and tissue cultures of *G. acaulis*, *G. punctata* and *G. lutea* have been investigated by using blot-hybridization. The decrease of rDNA amount was found in the callus cultures as com-

pared with the plants. In contrast to other species, *G. lutea* showed intragenome heterogeneity of rRNA genes as well as qualitative rDNA changes in tissue culture, in particular appearance of altered repeats. The relationship between the peculiarities of rRNA gene structure and their rearrangements in *in vitro* culture was suggested.

РЕЗЮМЕ. Методом блот-гібридизації проведено дослідження 18S-25S рДНК інтактних рослин і культури тканин *G. acaulis*, *G. punctata* і *G. lutea*. В калусних тканинах показано зменшення кількості повторів рибосомної ДНК по порівнянню з рослинами. Для *G. lutea*, в отличие от других видів, установлена індивідуальна гетерогенність генів рРНК, а також якісні зміни рДНК в культурі тканин, в частности появлення змінених повторів. Предполагается существование связи между особенностями структуры генів рРНК и их перестройками в культурі *in vitro*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Куприянова Н.С. Консервативность и изменчивость рибосомной ДНК эукариот // Молекуляр. биология. — 2000. — 34, № 5. — С. 753—765.
2. Волков Р.А., Панчук І.І., Борисюк Л.Г., Борисюк М.В. рДНК рослин: організація, еволюція, застосування // Цитология и генетика. — 2003. — 37, № 1. — С. 72—78.
3. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразова-

- ния *in vitro* // Физиология растений. — 1999. — 46, № 6. — С. 919—929.
4. Rani V., Raina S.N. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal // In Vitro Cell. Dev. Biol. (Plant). — 2000. — 36. — P. 319—330.
5. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana L.* // Физиология и биохимия культур. растений. — 2004. — 36, №4. — С. 327—334.
6. 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.
7. Маниатис Т., Фрич З., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
8. Jorgensen R.A., Cuellar R.E., Thompson W.F., Kavanagh T.A. Structure and variation in ribosomal RNA genes of pea // Plant Mol. Biol. — 1987. — 8. — P. 3—12.
9. Rogers S.O., Bendich A.J. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer // Plant Mol. Biol. — 1987. — 9. — P. 509—520.
10. Мельник В.М., Андрєєв І.О., Спіридонова К.В., Кунах В.А. Рестрикційне картування та варіабельність 18S—25S рибосомних генів деяких видів роду *Gentiana L.* // Цитология и генетика. — 2003. — 37, № 5. — С. 65—71.

Надійшла 19.06.06