

В.М. МЕЛЬНИК¹, К.В. СПІРІДОНОВА¹,
І.О. АНДРЄЄВ¹, Н.М. СТРАШНЮК², В.А. КУНАХ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
03143, Київ, вул. Акад. Зabolотного, 150,
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

² Тернопільський державний педагогічний
університет ім. Володимира Гнатюка,
46027, Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2

ВАРИАБЕЛЬНІСТЬ ЯДЕРНОЇ 18S-25S рДНК *GENTIANA LUTEA* L. В ПРИРОДІ ТА В КУЛЬТУРІ ТКАНИН IN VITRO



Методом blot-гібридизації досліджено послідовність 18S-25S рДНК в геномах рослин різних популяцій та культурі тканин *G. lutea*. Встановлено, що рибосомні повтори представлені різними варіантами, відмінними за розміром, а також за наявністю додаткового HindIII-сайта рестрикцій. В геномі окремої рослини зазвичай спостерігаються кілька варіантів повторів рДНК. Виявлено міжпопуляційну мінливість за кількісним співвідношенням та наявністю окремих з них. У калюсних тканинах порівняно з рослиною вихідної популяції спостерігаються зміни в наборі варіантів повторів рДНК, які, однак, не виходять за межі внутрішньої варіабельності. Виявлено особливість — невипадковість геномних змін в процесі адаптації клітин до умов росту *in vitro* — в певній мірі дає можливість прогнозувати ці зміни в культурі тканин.

© В.М. МЕЛЬНИК, К.В. СПІРІДОНОВА, І.О. АНДРЄЄВ,
Н.М. СТРАШНЮК, В.А. КУНАХ, 2004

Вступ. В умовах інтенсивних змін природного середовища внаслідок антропогенної трансформації екосистем питання раціонального використання та охорони ресурсів лікарських рослин набуває особливої актуальності. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є введення рослин в культуру *in vitro*. Застосування такого підходу спрямоване на збереження генофонду певного виду та забезпечення фармацевтичної промисловості цінною сировиною з одночасним збереженням цілісності природних фітокомплексів. З метою збереження генофонду та подальшого використання як перспективного джерела для отримання цінних біологічно активних речовин в лабораторії екології і біотехнології Тернопільського державного педагогічного університету були одержані калюси з рослин трьох видів роду *Gentiana* L.: *G. lutea*, *G. acaulis*, *G. punctata* — зникаючих лікарських рослин, занесених до Червоної книги України [1].

Відомо, що при культивуванні рослинних клітин в умовах *in vitro* відбуваються зміни геному, причому значно швидше, ніж у природі [2, 3]. Проте, при дослідженні геномної ДНК отриманих калюсних культур лише в одного з видів, а саме *G. lutea*, були виявлені відмінності рДНК між інтактною рослиною та калюсними тканинами [4]. Поряд з цим вивчення генів 18S-25S рРНК деяких видів роду *Gentiana* L. показало, що дана послідовність характеризується міжвидовою варіабельністю [5]. Серед досліджуваних видів вирізнявся *G. lutea*, в якого 18S-25S рДНК була представлена не одним мажорним класом послідовностей, як у решти видів, а виявлялася у складі декількох варіантів повторів, різних за довжиною. В даній роботі вивчали 18S-25S рДНК в культурі тканин *in vitro* та в геномах інтактних рослин *G. lutea* з різних географічно віддалених популяцій.

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження були інтактні 4–5-річні рослини *G. lutea*, взяті з різних популяцій: гора Пожижевська, полонина Рогнеська (Чорногірський хребет Карпат), гора Троїська (Свидовецький хребет Карпат), а також калюсна тканина *G. lutea*. Дана культура одержана з корінців проростків, що вирощені з насіння рослин пожижевської популяції, і культивувалася на середовищі Мурасіге-Скуга [1].

ДНК виділяли з молодих листків рослин та калюсної культури 23-го і 50-го пасажів за ме-

Варіабельність ядерної 18S-25S рДНК *Gentiana lutea* L...

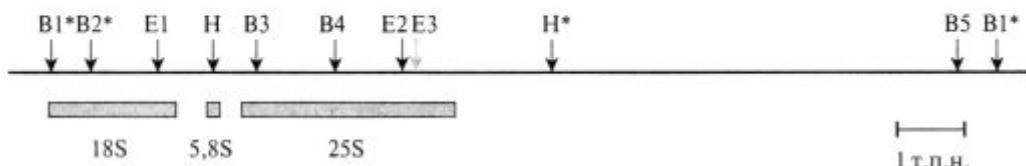


Рис. 1. Схема локалізації сайтів вільнівання для HindIII (H), BamHI (B) і EcoRI (E) ендонуклеаз рестрикції в послідовності рДНК рослини *G. lutea* пожижевської популяції. * Частково метильований сайт

тодом [6]. Гідроліз ДНК проводили за допомогою ендонуклеаз рестрикції BamHI, EcoRI, HindIII протягом 4 год згідно з інструкцією фірми-виробника («MBI Fermentas», Литва). Продукти гідролізу розділяли за допомогою горизонтального гель-електрофорезу в 1%-ному агарозному («Serva», США) гелі в 0,5×ТАЕ 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 blot-гібридизації використовували повний ядерний рибосомний ген пшениці (плазмідна конструкція pTA71) [8] довжиною 9 т.п.н. Зонд мітили $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP методом розсіяної затравки. Blot-гібридизацію проводили за методикою [7].

Результати досліджень та їх обговорення. Гени рРНК, виходячи з їх унікальних властивостей (багатокопійності, кластерної організації, консервативності кодуючих та варіабельності спейсерних ділянок), успішно використовуються в ролі інформативних маркерів для еволюційних досліджень як в природі, так і в культурі тканин. Раніше було проведено картування послідовності рДНК інтактної рослини *G. lutea* за сайтами окремих ендонуклеаз рестрикції (рис. 1). Встановлено, що HindIII рестриктаза вирізає повний повтор, який включає 18S, 5,8S, 25S рДНК і ділянку нетранскрибованого міжгенного спейсера (HTC), гідролізуючи послідовність повтору в області гена 5,8S рРНК. Крім того, в меншій частині повторів може виявлятися додатковий HindIII-сайт, розташований в ділянці HTC. Для EcoRI рестриктази виявлено три сайти, один з яких міститься в 18S рДНК і два розташовані поруч на межі 25S рДНК та HTC так, що при розщепленні повтору цією рестриктазою виявляються лише два фрагменти. Фермент BamHI має п'ять сайтів, два з яких розташовані по границях HTC, що дає можливість вирізати цю варіабельну ділянку рибо-

сомного повтору. До того ж деякі з сайтів можуть піддаватися частковому метилюванню, що призводить до утворення додаткових мінорних фрагментів при гідролізі.

Результати гідролізу ДНК досліджуваних об'єктів HindIII-рестриктазою з подальшою гібридизацією з повним повтором 18S-25S рДНК пшениці, що подані на рис. 2, демонструють варіабельність повторів рДНК за довжиною та наявністю додаткового сайта в геномах рослин різних популяцій та калюсних тканин. Міжпопуляційна варіабельність рибосомних повторів проявляється в тому, що крім спільніх фрагментів довжиною 13,0–14,5 т.п.н., що відповідають повному рибосомному повтору,

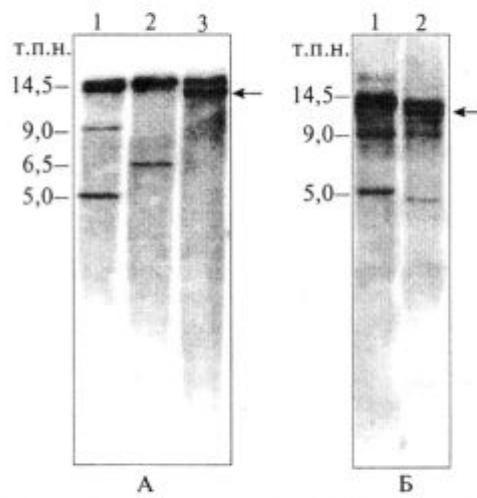


Рис. 2. Варіабельність повторів 18S-25S рДНК *G. lutea* в геномах інтактних рослин та калюсних культур. Blot-гібридизація ДНК інтактних рослин та калюсних культур *G. lutea*, гідролізованих HindIII ендонуклеазою рестрикції, з повним повтором рДНК пшениці. А – варіабельність рДНК серед інтактних рослин з пожижевської (1); рогнеської (2) та трояської (3) популяцій. Б – перебудови в культурі тканин *in vitro*: 1 – рослина пожижевської популяції; 2 – калюс, 23-й пасаж. Стрілками позначені подібні за довжиною фрагменти рДНК, які змінюються в калюсі і одночасно є варіабельними у рослин різних популяцій

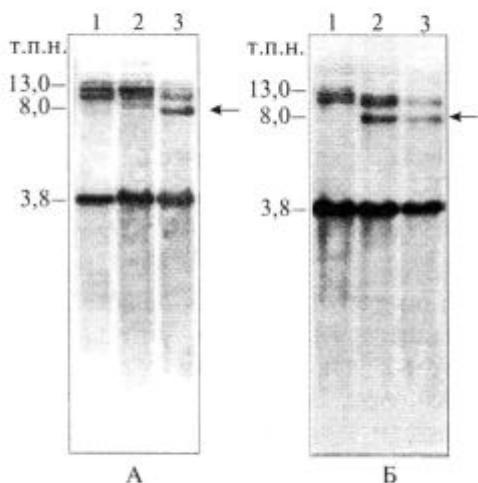


Рис. 3. Варіабельність повторів 18S-25S рДНК *G. lutea*: варіабельні та консервативні ділянки. Блот-гібридизація ДНК інтактних рослин та калюсних культур *G. lutea*, гідролізованих EcoRI ендонуклеазою рестрикції, з повним повтором рДНК пшениці. А — варіабельність рДНК серед інтактних рослин з пожижевської (1); рогнеської (2) та трояської (3) популяцій. Б — перебудови в культурі тканин *in vitro*: рослина пожижевської популяції (1); калюс, 23-й пасаж (2) та 50-й пасаж (3). Тут і на рис. 4 стрілками позначено подібні за довжиною фрагменти рДНК, які змінюються в калюсі і одночасно є варіабельними у рослин різних популяцій

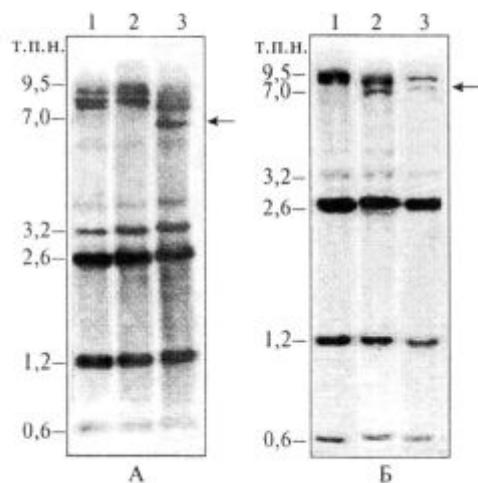


Рис. 4. Варіабельність повторів 18S-25S рДНК *G. lutea*: варіабельні та консервативні ділянки. Блот-гібридизація ДНК інтактних рослин та калюсних культур *G. lutea*, гідролізованих BamHI ендонуклеазою рестрикції, з повним повтором рДНК пшениці. А — варіабельність рДНК серед інтактних рослин з пожижевської (1); рогнеської (2) та трояської (3) популяцій. Б — перебудови в культурі тканин *in vitro*: рослина пожижевської популяції (1); калюс, 23-й пасаж (2) та 50-й пасаж (3)

на гібридизаційних профілях були виявлені специфічні для кожного з об'єктів фрагменти: 5,0 і 9,0 т.п.н. — для рослини пожижевської популяції (рис. 2, А, дор. 1), 6,5 т.п.н. — для рослини рогнеської популяції (рис. 2, А, дор. 2), 12,0 т.п.н. — для рослини трояської популяції (рис. 2, А, дор. 3). Фрагменти розміром 5,0 і 9,0 т.п.н. (рис. 2, Б, дор. 1) та 6,5 т.п.н. (рис. 2, А, дор. 2) утворюються внаслідок гідролізу додаткового HindIII-сайту, розташованого в нетранскрибованому міжгенному спейсері. На HindIII гібридизаційному профілі рослини з трояської популяції (рис. 2, А, дор. 3) присутній фрагмент ~12,0 т.п.н., що є повним рибосомним повтором, який був виявлений нами лише у рослин даної популяції. Цей варіант повтору міг утворитися в результаті делеції ділянки рДНК розміром 1–2,5 т.п.н.

Між калюсними тканинами, які походять від рослин з пожижевської популяції, та інтактною рослиною з тієї ж популяції *G. lutea* виявляються відмінності за набором HindIII фрагментів рибосомного повтору (рис. 2, Б). Зокрема в калюсі виявляється клас повторів розміром 12 т.п.н. Поряд з цим в клітинах *in vitro* виявляються два мінорних фрагменти довжиною 9,3 та 4,5 т.п.н., відмінних за розміром від таких в інтактній рослині.

Наведені на рис. 3 результати EcoRI-гідролізу 18S-25S рДНК демонструють наявність у всіх об'єктів консервативного фрагмента розміром 3,8 т.п.н. та групи фрагментів в діапазоні 8–10,5 т.п.н. Останні є варіабельними за довжиною та копійністю у рослин з різних популяцій (рис. 3, А). Водночас виявляються відмінності за наявністю та кількісним співвідношенням фрагментів цієї групи між культивованими клітинами та інтактною рослиною (рис. 3, Б).

BamHI-рестрикційний аналіз генів рРНК виявляє у кожного з об'єктів по шість консервативних за довжиною фрагментів (від 0,6 до 6,3 т.п.н.) та групу фрагментів розміром в діапазоні 7–9,5 т.п.н. (рис. 4). Ця група BamHI-фрагментів, подібно до EcoRI-фрагментів довжиною 8–10,5 т.п.н., є варіабельною як серед інтактних рослин з різних популяцій (рис. 4, А), так і в культурі тканин *in vitro* (рис. 4, Б).

Лабільні фрагменти рДНК, що спостерігаються на EcoRI та BamHI рестрикційних

профілях досліджуваних об'єктів, містять ділянку НТС (див. схему на рис.1). Їх сукупність характеризує наявний в конкретному геномі набір варіантів повторів, відмінних за розміром. Таким чином, в індивідуальних геномах рослин і культивованих тканин *G. lutea* рДНК представлена набором різних за довжиною повторів, відмінності між якими зумовлені варіаціями послідовності НТС. Відмінності за складом групи лабільних EcoRI та BamHI фрагментів, які спостерігаються між рослинами різних популяцій, свідчать про те, що співвідношення повторів рДНК різного розміру не є стабільним показником, а може варіювати в значній мірі в межах виду.

Після визначення розмірів повних повторів рДНК за результатами наведеного рестрикційного аналізу було встановлено, що в геномах рослин *G. lutea* з трьох популяцій в різній кількості наявні повтори розміром 13,0; 13,7 та 14,5 т.п.н. Серед аналізованих об'єктів виділяється рослина з трояської популяції, в геномі якої на додачу до згаданих вище виявляється повтор розміром 12,0 т.п.н. і в той же час не виявлено повторів з додатковим HindIII-сайтом.

Порівняння спектрів фрагментів рДНК калюсних тканин *G. lutea*, що походять від рослин з пожижевської популяції, і рослин з тієї ж популяції виявило відмінності, які свідчать про зміни у наборі варіантів повторів, що відбулися в культурі *in vitro*. З одного боку, в калюсному геномі при наявності деяких з варіантів рДНК, характерних для інтактної рослини, не детектиуються повтори розміром 14,5 т.п.н., з іншого — в калюсі спостерігається варіант повтору довжиною 12 т.п.н. Ще одна відмінність порівнюваних геномів виявляється у розмірі фрагментів рДНК, які утворюються при розщепленні додаткового HindIII-сайта, розташованого в НТС. Виявлені відмінності спостерігаються в геномах калюсних тканин 23-го та 50-го пасажів, що може свідчити про те, що ці зміни відбуваються на більш ранніх етапах культивування (до 23-го пасажу) і зберігаються у стабільній калюсній культурі. При аналізі отриманих результатів звертає на себе увагу те, що виявлений у калюсних тканинах *G. lutea* додатковий варіант рибосомних повторів (12 т.п.н.) подібний до такого в геномі рослини з іншої (трояської) популяції.

Таким чином, у *G. lutea* нами виявлені такі особливості рДНК: 1) індивідуальна гетерогенність — в одному геномі існує кілька варіантів повторів, відмінних за розміром, копійністю, а також наявністю додаткового HindIII-сайта; 2) міжпопуляційна варіабельність — обумовлена відмінностями 18S-25S рибосомних повторів за розміром, копійністю, а також за наявністю та розташуванням додаткового HindIII-сайта; 3) зміни в культурі тканин *in vitro* — в калюсних тканинах спостерігаються зміни в наборі варіантів повторів рДНК порівняно з інтактною рослиною вихідної популяції.

Встановлена варіабельність 18S-25S рибосомних повторів *G. lutea* як у культурі тканин *in vitro*, так і в природі (індивідуальна гетерогенність і міжпопуляційна мінливість) зумовлена перебудовами в ділянці НТС, зокрема, очевидно, кількістю субповторів, що формують окремі його ділянки. Як відомо, нетранскрибований спейсер є ділянкою рДНК, яка еволюціонує із найбільшою швидкістю, тоді як кодуючі послідовності є одними з найбільш консервативних у еукаріотів [9]. Раніше вважалось, що поліморфізм ділянки НТС не має істотного функціонального значення, проте недавно на рослинах було переконливо показано, що до складу НТС входить ряд субповторів, які мають різне функціональне значення. Наприклад, кількість субповторів у передпромоторній області може впливати на інтенсивність експресії генів рРНК [9, 10]. Виходячи з того, що гетерогенність повторів рДНК розміром 13,0; 13,7 та 14,5 т.п.н. у *G. lutea* обумовлена відмінностями їх розмірів на дискретну величину (~700 п.н.), можна припустити, що її молекулярною основою є різниця в кількості субповторів у складі НТС. Тоді зменшення довжини певного класу рибосомних повторів, яке спостерігається у культурі *in vitro*, може розглядатися як механізм регуляції експресії генів рРНК в змінених умовах існування.

Отримані результати дозволяють вважати, що послідовність 18S-25S рДНК в індивідуальних геномах *G. lutea* може бути представлена різними варіантами повторів, відмінними за розміром, а також за наявністю додаткового HindIII-сайта в НТС, при цьому в геномі окремої рослини зазвичай спостерігається кілька з цих варіантів. Аналіз геномів рослин з різних популяцій вия-

вив внутрівидову мінливість за кількісним співвідношенням та наявністю окремих варіантів рибосомних повторів. При аналізі перебудов рДНК, знайдених в культурі *in vitro* *G. lutea*, привертає увагу той факт, що повтори розміром 12 т.п.н., які відрізняють геном калюсних тканин від геному рослини вихідної популяції, наявні також в інтактних рослинах іншої (трояської) популяції. Таким чином, зміни в наборі варіантів повторів рДНК, які спостерігаються в калюсних тканинах, не виходять за межі внутрівидової мінливості. З цього висновку витікає ряд важливих наслідків, що мають як фундаментальне, так і прикладне значення.

По-перше, в калюсі *G. lutea* перебудовам піддаються ті ділянки рДНК, для яких властива міжвидова [5] та міжпопуляційна варіабельність. Виявлена особливість — невипадковість геномних змін в процесі адаптації клітин до умов росту *in vitro* — в певній мірі дає можливість прогнозувати ці зміни в культурі *in vitro*. По-друге, отримані дані свідчать, що послідовність рДНК в геномі *G. lutea*, незважаючи на значну внутрівидову варіабельність, обумовлену мінливістю нетранскрибованого міжгенного спейсера, є консервативною структурою. По-третє, результати проведених досліджень вказують на можливість застосування культури *in vitro* *G. lutea*, а також використаних умов культивування (зокрема низького вмісту в живильному середовищі екзогенних фітогормонів) для збереження генофонду цього цінного зникаючого виду.

Висновки. Виявлено такі особливості рДНК *G. lutea*: 1) індивідуальна гетерогенність — в одному геномі існує кілька варіантів повторів, відмінних за розміром, копійністю, а також наявністю додаткового HindIII-сайта; 2) міжпопуляційна варіабельність — обумовлена відмінностями 18S-25S рибосомних повторів за розміром, копійністю, а також за наявністю та розташуванням додаткового HindIII-сайта; 3) зміни в культурі тканин *in vitro* — в калюсних тканинах спостерігаються зміни в наборі варіантів повторів рДНК порівняно з інтактною рослиною вихідної популяції; 4) порівняння перебудов рДНК калюсних тканин із міжпопуляційною мінливістю свідчить про їх невипадковий характер, а саме про подібність змін в природі та в культурі тканин *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 пшениці. Робота виконувалась за часткової фінансової підтримки наукової програми НАН України «Фізіологічно-біохімічні та молекулярно-генетичні основи функціонування живих систем і розробка принципів керування ними».

SUMMARY. 18S-25S rDNA sequence in genomes of *G.lutea* plants from different natural populations and from tissue culture has been studied with blot-hybridization method. It was shown that ribosomal repeats are represented by the variants which differ for their size and for the presence of additional HindIII restriction site. Genome of individual plant usually possesses several variants of DNA repeats. Interpopulation variability according to their quantitative ratio and to the presence of some of them has been shown. Modifications of the range of rDNA repeats not exceeding intraspecific variability were observed in callus tissues in comparison with the plants of initial population. Non-randomness of genome modifications in the course of cell adaptation to *in vitro* conditions makes it possible to some extent to forecast these modifications in tissue culture.

РЕЗЮМЕ. Методом блот-гібридизації изучены ядерные гены 18S-25S рРНК растений разных популяций и культуры тканей *G. lutea*. Установлено, что у представителей вида рибосомные повторы представлены вариантами, отличающимися по размеру, а также наличию дополнительного HindIII-сайта рестрикции. В геноме отдельного растения обычно наблюдаются несколько вариантов повторов рДНК. Выявлена межпопуляционная вариабельность геномов растений по количественному соотношению и наличию отдельных из них. В каллусных тканях по сравнению с растением исходной популяции обнаружены изменения набора вариантов повторов рДНК, которые, однако, не выходят за пределы внутривидовой вариабельности. Выявленная особенность — неслучайность геномных изменений в процессе адаптации клеток к условиям роста *in vitro* — в определенной степени дает возможность прогнозировать эти изменения в культуре тканей.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. // Фізиологія і біохімія культур. растений. — 2004. — **36**, № 4. — С. 327–334.
2. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиология растений. — 1999. — **46**, № 6. — С. 919–929.
3. Raini V., Raina S.N. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropaginated plants: a critical

- reappraisal // In Vitro Cell. Dev. Biol. (Plant). — 2000. — 36. — P. 319–330.
4. Mel'nyk V.M., Spiridonova K.V., Andreev I.O., Strashnyuk N.M., Kunakh V.A. Rearrangements of the 18S-25S ribosomal RNA nuclear genes in culture in vitro of some *Gentiana* L. species // Бюл. Нікіт. бот. саду. — 2002. — № 86. — С. 63–66.
5. Мельник В.М., Андреєв І.О., Спірідонова К.В., Кунах В.А. Рестрикційне картування та варіабельність 18S-25S рибосомних генів деяких видів роду *Gentiana* L. // Цитологія і генетика. — 2003. — 37, № 5. — С. 65–71.
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., Фріч З., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
8. Gerlach W.L., Bedbrook J.R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley // Nucl. Acids Res. — 1979. — 7, № 7. — P. 1869–1879.
9. Куприянова Н.С. Консервативность и изменчивость рибосомной ДНК эукариот // Молекуляр. біология. — 2000. — 34, № 5. — С. 753–765.
10. Волков Р.А., Панчук І.І., Борисюк Л.Г., Борисюк М.В. рДНК рослин: організація, еволюція, застосування // Цитологія і генетика. — 2003. — 37, № 1. — С. 72–78.

Надійшла 10.02.04