УДК 575.22:582.923.1

ПОЛІМОРФІЗМ ЯДЕРНОЇ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ *GENTIANA* L.

В.М. МЕЛЬНИК

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03680, Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

Мета. *Метою роботи було оцінити рівень міжвидового поліморфізму 5S рДНК представників роду Gentiana L., а також вивчити можливості використання цієї ділянки геному в молекулярній таксономії тирличів.* ***Методи.*** *За допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів, комплементарних до кодуючої ділянки 5S рДНК, проведено дослідження дев'яти видів із п'яти секцій.* ***Результати.*** *Довжина 5S рДНК коливалася в межах 430–600 п.н., для більшості (2/3) досліджених видів становила 500 п.н. Різні види однієї секції можуть мати як однакову довжину 5S рДНК (секції Gentiana і Cruciata), так і різну (секція Pneumonanthe). Розмір 5S рДНК не корелював ні з довжиною 45S рДНК, ні з числом хромосом.* ***Висновки.*** *Отримані дані свідчать про незначний міжвидовий поліморфізм розміру 5S рДНК тирличів, а також про необхідність використання різних генетичних методів і маркерів для коректної оцінки варіабельності видів роду Gentiana, їхньої систематизації та встановлення філогенетичних взаємозв'язків між окремими таксонами.*

Ключові слова: *гени 5S рРНК, ПЛР-аналіз, міжвидовий поліморфізм, види роду Тирлич (Gentiana L.), молекулярна таксономія.*

Вступ. Тирлич (*Gentiana* L.) – типовий рід родини *Gentianaceae Juss.*, який включає близько 400 видів [1]. Це складний у систематичному відношенні таксон, чим і пояснюється відсутність загальновизнаної системи даного роду. Остаточно не вирішеними залишаються питання обсягу роду *Gentiana*, систематичної цінності ознак, ступеня їх мінливості та таксономічного статусу окремих поліморфних видів. Останнім часом для систематизації рослин та встановлення філогенетичних взаємозв'язків між окремими таксонами дедалі частіше використовують молекулярно-генетичні маркери. Одними з таких маркерів є гени, які кодують рибосомні РНК [2–5].

У вищих рослин ядерні гени 5S рибосомної РНК (або 5S рДНК) організовані в один або кілька кластерів тандемно повторюваних послідовностей розміром від 200 до 900 п.н., хромосомні локуси яких не збігаються з локусами високомолекулярної 45S рДНК. Особливості будови генів рРНК – багатокопійність, кластерна організація, висока консервативність кодуючих ділянок і варіабельність спейсерних послідовностей, а також наявність механізмів, що забезпечують узгоджену еволюцію повторів рДНК всередині кластера, роблять їх зручною моделлю для з'ясування питань екології, популяційної генетики, селекції і систематики [6].

Метою роботи було дослідження міжвидового поліморфізму 5S рДНК представників роду *Gentiana* L., а також вивчення можливості використання цієї ділянки геному в молекулярній таксономії тирличів.

© В.М. МЕЛЬНИК, 2013

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували рослини 9 видів тирличів, які належать до різних секцій та відрізняються за морфологією, анатомією, умовами зростання та ін. Зразки *G. acaulis*, *G. laciniata*, *G. lutea*, *G. punctata*, *G. asclepiadea*, *G. pneumonanthe*, *G. cruciata* були взяті з природних місць зростання в Україні; *G. septemfida* і *G. dahurica* – з рослин, отриманих з насіння колекції тирличів Ботанічного саду імені акад. О.В. Фоміна Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

ДНК виділяли з листків за методикою з використанням ЦТАБ-буфера [7]. Гель-електрофорез продуктів ампліфікації проводили в 2% агарозному гелі. Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням пари праймерів p5S1 (5'-GGATGGGTGACCTCCCGGGAAG TCC–3') і p5S2 (5'-GCTTAACTGCGGAGTTCTGATGG G-3') [8].

Ампліфікацію проводили в термоциклері Терцик MC2 («Біотехнологія», Росія). Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ dNTP, 1,25 U Taq-полімерази, 0,25 мкМ праймера, 1×ПЛР-буфер з 1,5 мМ $MgCl_2$. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію проводили в такому режимі: 1 цикл (95 °С – 3 хв); 5 циклів (95 °С – 30 с, 54 °С – 30 с, 72 °С – 1 хв); 30 циклів (94 °С – 20 с, 55 °С – 20 с, 72 °С – 40 с); 1 цикл (72 °С – 5 хв).

Результати та обговорення

Аналіз результатів електрофоретичного розділення ПЛР-продуктів показав, що розміри повторюваних послідовностей 5S рДНК видів роду *Gentiana* L. коливаються в межах 430–600 п.н. (табл. 1). Як видно з наведеної таблиці, для більшості видів (6 із 9, або 2/3 вибірки) довжина повного гена 5S рРНК становить 500 п.н. Найбільший розмір досліджуваного рибосомного повтору характерний для *G. acaulis* (600 п.н.), найменший – для *G. pneumonanthe* і *G. laciniata* (430 п.н.).

Аналіз наведених у табл. 1 даних дозволив встановити певні особливості генетичної мінливості тирличів:

1) різні види однієї секції можуть мати як однакову довжину 5S рДНК (секції *Gentiana* і *Cruciata*), так і різну (секція *Pneumonanthe*);

2) види секції *Cruciata* характеризуються однаковим розміром 5S рибосомного повтору, але різним (кратно збільшеним у *G. cruciata*) диплоїдним набором хромосом;

Таблиця 1. Генетичний поліморфізм досліджених видів роду *Gentiana* L.

Секція[1]	Вид	Довжина 5S рДНК, п.н.	Довжина[2] 45S рДНК, п.н.	Число[3] хромосом, 2*n*
Ciminalis	*G. acaulis*	600	11 000	36
Gentiana	*G. lutea*	500	12 000–14 500	40
	G. punctata	500	11 800	40
Cruciata	*G. cruciata*	500	–	52
	G. dahurica	500	–	26[4]
Pneumonanthe	*G. asclepiadea*	500	10 500	36
	G. septemfida	500	–	26[5]
	G. pneumonanthe	430	–	26
Chondrophyllae	*G. laciniata*	430	–	–

Примітки: [1] Поділ на секції поданий за Ho, Liu (1991) [1]; [2] Згідно з даними Мельника та ін. (2003) [3]; [3] Згідно з даними Страшнюк та ін. (2008) [9]; [4] Згідно з даними Rork (1949) [10]; [5] Згідно з даними Gagnidze et al. (1992) [11]; «–» – не досліджено.

3) види секції *Gentiana* мають однакову довжину 5S рДНК і число хромосом, але різні розміри повтору 45S рДНК;

4) види секції *Pneumonanthe* з однаковою довжиною 5S рибосомного повтору (500 п.н. у *G. asclepiadea* і *G. septemfida*) характеризуються різним числом хромосом, а види з однаковим диплоїдним набором хромосом (2*n*=26 для *G. pneumonanthe* і *G. septemfida*) мають різний розмір 5S рДНК.

У літературі зустрічаються відомості про значну варіабельність розміру генів 5S рРНК не лише у різних видів, а й для геному одного виду. Такі дані відомі для деяких представників роду *Nicotiana* (*Solanaceae*), надродової групи Callistahys (Fabaceae) і роду *Rosa* (*Rosaceae*) [12–14]. Автори досліджень роду *Rosa* L. пояснюють це явище алополіплоїдним походженням видів та недостатньою швидкістю концертної еволюції. З огляду на встановлене раніше поліплоїдне походження багатьох тирличів, а також на суттєву міжвидову і навіть внутрішньогеномну (для *G. lutea*) гетерогенність за розміром 45S рДНК [3, 9] можна було сподіватися на значну мінливість довжини 5S рДНК. Проте результати ПЛР-аналізу з використанням в ролі молекулярно-генетичного маркера 5S рДНК свідчать, що довжина досліджуваної послідовності в геномах різних видів роду *Gentiana* характеризується незначним поліморфізмом.

Загалом, отримані дані свідчать про необхідність використання різних генетичних методів і маркерів для дослідження міжвидової варіабельності видів роду *Gentiana*. Лише комплекс генетичних маркерів дозволяє диференціювати види як з різних секцій, так і в межах однієї секції.

Висновки

Гени 5S рРНК представників роду *Gentiana* характеризуються міжвидовими відмінностями за розміром повтору. На основі порівняння цієї послідовності з іншими генетичними маркерами (45S рДНК і числом хромосом 2*n*) з'ясовано деякі особливості генетичного поліморфізму тирличів. Зокрема, показано, що розмір 5S рДНК не корелює ні з довжиною 45S рДНК, ні з числом хромосом і може відрізнятися навіть у видів однієї секції. Отримані дані свідчать про необхідність використання різних генетичних методів і маркерів для коректної оцінки міжвидової варіабельності видів роду *Gentiana*, їхньої систематизації та встановлення філогенетичних взаємозв'язків між окремими таксонами.

Автор статті висловлює подяку канд. біол. наук Комарницькому І.К. (Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАНУ) за люб'язно надані праймери до 5S рДНК, а також канд. біол. наук Голубенко А.В. (Ботанічний сад імені акад. О.В. Фоміна) за люб'язно надане насіння G. septemfida і G. dahurica.

Перелік літератури

1. *Ho T.-N., Liu S.-W.* The infrageneric classification of *Gentiana* (Gentianaceae) // Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.), Bot. – 1990. – Vol. 20, №2. – P. 169–192.
2. *Волков Р.А., Панчук І.І., Борисюк Л.Г., Борисюк М.В.* рДНК рослин: організація, еволюція, застосування // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37, №1. – С. 72–78.
3. *Мельник В.М., Андрєєв І.О., Спірідонова К.В., Кунах В.А.* Рестрикційне картування та варіабельність 18S-25S рибосомних генів деяких видів роду *Gentiana* L. // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37, №5. – С. 65–71.
4. *Тинкевич Ю.О., Волков Р.А.* Структурна організація 5S рибосомної ДНК *Rosa nitida* Willd. // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т. 9, №2. – С. 276–282.
5. *Poczai P., Hyvцnen J.* Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects // Mol. Biol. Rep. – 2010. – Vol. 37. – P. 1897–1912.
6. *Куприянова Н.С.* Консервативность и изменчивость рибосомной ДНК эукариот // Молекулярная биология. – 2000. – Т. 34, №5. – С. 753–765.
7. *Rogers I., Bendich A.* Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. – 1985. – Vol. 5. – P.69–76.
8. *Zanke C., Borisjuk N., Ruoss B., Schilde-Rentschler L., Ninnemann H., Hemleben V.* A specific oligonucleotide of the 5S rDNA spacer and species-specific elements identify symmetric

somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. pinnatisectum* // Theor. Appl. Genet. – 1995. – Vol. 90, №5. – P. 720–726.
9. *Страшнюк Н.М., Твардовська М.О., Мельник В.М.* Каріологія європейських видів роду *Gentiana* L. // Укр. ботан. журн. – 2008. – Т. 65, № 5. – С. 836–848.
10. *Rork C.L.* Cytological studies in the Gentianaceae // Amer. J. Bot. – 1949. – Vol. 36. – P. 687–701.
11. *Gagnidze R., Küpfer P., Yuan Y.-M.* Chromosome numbers of some Gentianaceae from the Caucasus // Bull. Soc. Neuchatel. Sci. Nat. – 1992. – Vol. 115. – P. 47–52.
12. *Crisp M.D., Appels R., Smith F.M., Keys W.M.S.* Phylogenetic evalution of 5S ribosomal RNA gene and spacer in the *Callistahys* group (Fabaceae: Mirbelieae) // Plant. Syst. Evol. – 1999. – Vol. 218. – P. 33–42.
13. *Matyasek R., Fulnecek J., Lim K.Y., Leitch A.R., Kovarik A.* Evolution of 5S rDNA unit arrays in the plant genus *Nicotiana* (Solanaceae) // Genome. – 2002. – Vol. 45. – P. 556–562.
14. *Тинкевич Ю.О., Сербенюк М.П., Волков Р.А.* Поліморфізм 5S рДНК видів роду *Rosa* L. // Наук. вісник Чернівецького ун-ту. – № 455, Сер. Біологія. – Чернівці: Рута, 2009. – С. 142–144.

Представлено Р.А. Волковим
Надійшла 13.05.2013

ПОЛИМОРФИЗМ ЯДЕРНОЙ 5S РИБОСОМНОЙ ДНК НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *GENTIANA* L.

В.Н. Мельник

Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины
Украина, 03680, Киев, ул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

Цель. Целью работы было оценить уровень межвидового полиморфизма 5S рДНК представителей рода *Gentiana* L., а также изучить возможности использования этого участка генома в молекулярной таксономии горечавок. **Методы.** С помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, направленных к 5S рДНК, проведено исследование девяти видов из пяти секций. **Результаты.** Длина 5S рДНК колебалась в пределах 430–600 п.н., для большинства (2/3) исследованных видов составляла 500 п.н. Различные виды одной секции могут иметь как одинаковую длину 5S рДНК (секции *Gentiana* и *Cruciata*), так и различную (секция *Pneumonanthe*). Размер 5S рДНК не коррелировал ни с длиной 45S рДНК, ни с числом хромосом. **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о незначительном межвидовом полиморфизме размера 5S рДНК горечавок, а также о необходимости использования различных генетических методов и маркеров для корректной оценки вариабельности видов рода *Gentiana*, их систематизации и установления филогенетических взаимосвязей между отдельными таксонами.

Ключевые слова: гены 5S рРНК, ПЦР-анализ, межвидовой полиморфизм, виды рода Горечавка (*Gentiana* L.), молекулярная таксономия.

POLYMORPHISM OF NUCLEAR 5S RIBOSOMAL DNA OF SOME *GENTIANA* L. SPECIES

V.M. Mel'nyk

Institute of Molecular Biology and Genetics,
NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 150
e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

Aim. The aim of the study was to assess the level of interspecific 5S rDNA polymorphism in the genus *Gentiana* L., as well as potential use of this genomic sequence in molecular taxonomy of gentians. **Methods.** Using polymerase chain reaction with primers complementary to 5S rDNA coding region, nine species from five sections were studied. **Results.** The length of 5S rDNA repeated unit ranged from 430 to 600 bp, and in the majority (2/3) of the studied species was 500 bp. Different species of the same section may have the same (sections *Gentiana* and *Cruciata*) or different (section *Pneumonanthe*) length of 5S rDNA. 5S rDNA size did not correlate with the length of 45S rDNA or the chromosome numbers. **Conclusions.** The data obtained demonstrate limited interspecific 5S rDNA length polymorphism in the genus *Gentiana*, and the need to use different methods and genetic markers for correct assessment of variability among the *Gentiana* species, their classification and establishment of phylogenetic relationships between different taxa.

Key words: 5S rRNA genes, PCR-analysis, interspecies polymorphism, species of the genus *Gentiana* L., molecular taxonomy.