

АНДРЕЄВ І.О.[✉], МЕЛЬНИК В.М., МИРЮТА Г.Ю., КУНАХ В.А.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

[✉]i.o.andreev@imbg.org.ua**ПОЛІМОРФІЗМ МІЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА ГЕНІВ 5S рРНК
ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ *GENTIANA* L.**

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 розташовані окремо від локусів 35S рДНК. Кодувальні частини сусідніх рибосомних повторів розділяє ділянка нетранскрибованого міжгенного спейсера (НТС), яка несе сигнали ініціації і термінації транскрипції. До складу НТС можуть входити декілька різновидів коротких субповторюваних одиниць, довжина яких складає 20–300 п. н. НТС є найбільш варіабельною частиною рибосомного повтору. Молекулярною основою гетерогенності НТС є різниця у кількості субповторів, що формують окремі ділянки спейсера і еволюціонують із значною швидкістю [1–3].

Особливості будови генів рРНК – багатокопійність, кластерна організація, висока консервативність кодувальних 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 [1–3].

Тирлич (*Gentiana* L.) – типовий рід родини Gentianaceae Juss., який включає близько 400 видів [4]. Це складний у системному відношенні таксон, чим і пояснюється відсутність загально-визнаної системи цього роду. Остаточного не вирішеними залишаються питання обсягу роду *Gentiana*, систематичної цінності ознак, ступеня їх мінливості та таксономічного статусу окремих поліморфних видів. Для вирішення цих та інших питань останнім часом все активніше застосовують молекулярні маркери, в тому числі й НТС 5S рДНК [5, 6].

Метою цієї роботи було визначення нуклеотидної послідовності міжгенного спейсера генів 5S рРНК деяких видів *Gentiana* флори

України, а також вивчення особливостей організації цієї ділянки у представників роду шляхом порівняльного аналізу з іншими видами, представленими у базі даних GenBank.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували рослини трьох видів тирличів, які відносяться до різних секцій та відрізняються за морфологією, анатомією, умовами зростання та ін. Зразки *G. acaulis*, *G. lutea*, *G. asclepiadea* були взяті з природних місць зростання в Україні.

ДНК виділяли з листків за методикою з використанням ЦТАБ-буфера [7].

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням пари праймерів p5S1 (5'–TCAAGCTTGGGTGACCTCC CGGGAAGTCC–3') і p5S2 (5'–СТААГСТТААСТГСГГГАТТСТГАТГГГ–3').

Ампліфікацію проводили в термоциклері Терцик МС2 («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 із 1,5 мМ MgCl₂. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію проводили в такому режимі: 1 цикл 95°C – 3 хв; 5 циклів (95°C – 30 с, 54°C – 30 с, 72°C – 1 хв); 30 циклів (94°C – 20 с, 55°C – 20 с, 72°C – 40 с); 1 цикл 72°C – 5 хв.

Отримані ПЛР-продукти розділяли за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, вирізували та очищали від агарози з використанням набору реагентів Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («МВІ Fermentas», Литва). Виділені фрагменти ДНК після гідролізу HindIII ендонуклеазою рестрикції лігували в плазмиду pUC18. Отримані плазмідні конструкції клонували в *E. coli*. Визначення послідовності клонуваних фрагментів ДНК проводили із використанням зворотного

М13-праймера в фірмі GATC-Biotech (Нідерланди).

Аналіз та вирівнювання отриманих послідовностей з використанням алгоритму ClustalW проводили у програмі Unipro UGENE [8].

Результати та обговорення

Електрофоретичне фракціонування ПЛР-продуктів ДНК показало, що в результаті реакції ампліфікації з парою праймерів p5S1 та p5S2 у *G. lutea* та *G. asclepiadea* утворюється два головних фрагменти розміром близько 300 та 550 п. н., та кілька фрагментів меншої інтенсивності (мінорних) розміром близько 450, 1200 та 800 п. н. (останній лише у *G. asclepiadea*), а у *G. acaulis* – один головний фрагмент розміром близько 600 п.н. та кілька мінорних фрагментів меншого розміру. Було проведено клонування і секвенування головних ПЛР-фрагментів розміром 550–600 п. н. з усіх трьох видів тирличів та 800 п. н. фрагмента з *G. asclepiadea* (рис. 1).

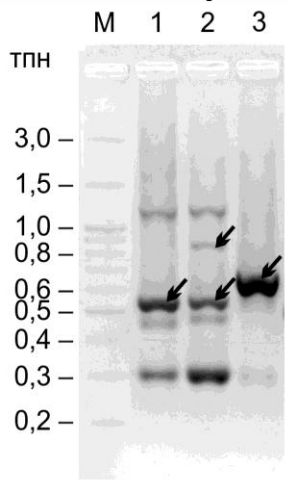


Рис. 1. Електрофоретичне фракціонування продуктів ампліфікації повтору 5S рДНК у трьох видів тирличів. 1 – *G. lutea*; 2 – *G. asclepiadea*; 3 – *G. acaulis*; М – молекулярний маркер. Клоновані фрагменти позначено стрілкою.

Секвенування двох клонованих послідовностей ПЛР-фрагмента гена 5S рРНК *G. acaulis* розміром близько 600 п. н. показало, що довжина нетранскрибованого спейсера становить 503 п. н. Пошук у базі даних GenBank виявив для цього виду ще одну послідовність, виділену з рослини з Альп (EF626794). Порівняльний аналіз показав високий рівень гомології між цими послідовностями. Так, два клони НТС з індивідуального геному *G. acaulis* з Українських Карпат мали рівень подібності більше 99 % (3 полі-

морфних нуклеотиди з 503), а послідовність рослини з Альп була ідентичною до них на 98 % (5 поліморфних нуклеотидів). Виявлені відмінності відносяться до замін типу G/C та C/T, три з числа поліморфних нуклеотидів, що відрізняють рослини з Альп та Карпат, утворюють групу: TACT/CGCC. Отримані дані свідчать про достатньо високу внутрішньовидову консервативність НТС 5S рДНК *G. acaulis*, хоча для остаточного підтвердження цього потрібен аналіз розширеної вибірки зразків з інших місць зростання.

Для *G. asclepiadea* було проаналізовано чотири клони фрагмента довжиною 550 п. н., та два клони фрагмента довжиною 800 п. н. За даними секвенування чотирьох клонів 550 п. н. фрагмента, ділянка НТС мала розмір 411 п. н. Як показав порівняльний аналіз послідовностей клонів різної довжини, ПЛР-фрагменти довжиною 800 п. н. утворилися внаслідок ампліфікації ділянки, що включала до свого складу частину НТС попереднього гена, кодувальний регіон та повний НТС. Рівень подібності між варіантами НТС становив 98–100 %.

Аналіз одного клону ПЛР-фрагмента гена 5S рРНК *G. lutea* показав, що розмір НТС цього виду становить 402 п. н.

Пошуком у базі даних GenBank було знайдено послідовності НТС гена 5S рРНК ще 11 видів роду *Gentiana*, які було залучено до подальшого аналізу цієї ділянки геному. Ці види разом із назвами секцій, до яких вони відносяться, номерами послідовностей в базі даних GenBank та довжиною ділянки НТС наведено у таблиці.

Вирівнювання та порівняльний аналіз послідовностей НТС 5S рДНК дозволили виділити дві групи видів, які суттєво відрізнялися за будовою цієї ділянки гена (рис. 2). До першої групи увійшли три види з території Східної Азії, які належать до секції *Pneumonanthe*. Другу групу сформували 7 альпійських видів переважно з території Європи з секції *Calathianae*, які характеризуються значною подібністю за послідовністю НТС, та три досліджені нами види. *G. rigescens* Franch. мав найменшу за розміром ділянку НТС (222 п. н.) і значно відрізнявся від інших видів за її послідовністю, тому при побудові філогенетичного дерева цей вид використали як зовнішню групу.

Ділянка НТС 5S рРНК усіх проаналізованих представників роду *Gentiana*, як і в інших видів, містить на початку оліго-дТ мотив, який відіграє роль ділянки термінації транскрипції для РНК-полімерази III евка-

ріотів, та АТ-багату ділянку, що передуює кодувальному регіону гена 5S рРНК і, як припускають, є сайтом ініціації транскрипції.

Таблиця. Види, послідовності НТС гена 5S рРНК яких були використані для порівняльного аналізу

Секція	Вид	Номер в GenBank	Довжина НТС, п.н.
<i>Calathianae</i>	<i>G. bavarica</i>	EF626753	384
	<i>G. brachyphylla</i> subsp. <i>favratii</i>	EF626760	388
	<i>G. nivalis</i>	EF626783	495
	<i>G. pumila</i>	EF626764	368
	<i>G. rostanii</i>	EF626789	372
	<i>G. terglouensis</i>	EF626762	386
	<i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i>	EF626768	371
<i>Ciminalis</i>	<i>G. acaulis</i>	EF626794	503
	<i>G. acaulis</i>	–	503
<i>Gentiana</i>	<i>G. lutea</i>	–	402
<i>Monopodiae</i>	<i>G. rigescens</i>	GQ864058	218
<i>Pneumonanthe</i>	<i>G. asclepiadea</i>	–	411
	<i>G. manshurica</i>	GQ864048	414
	<i>G. triflora</i>	GQ864053	414
	<i>G. scabra</i>	GQ864042	413

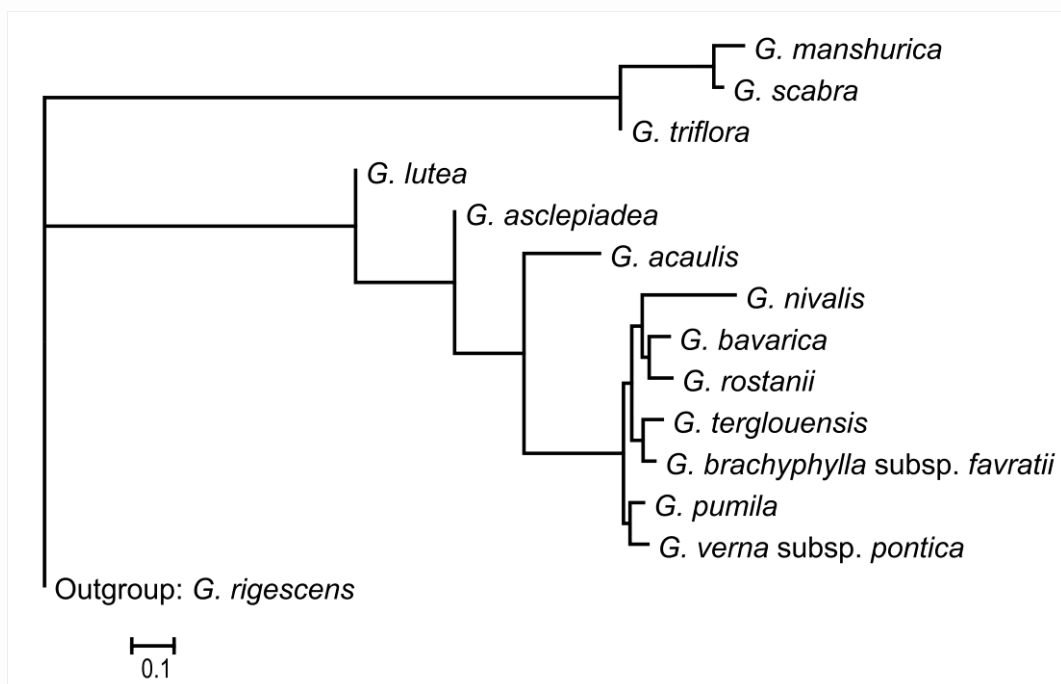


Рис. 2. Філограма видів роду тирлич (*Gentiana*), побудована на основі послідовності НТС гена 5S рДНК за алгоритмом Neighbour Joining. У якості зовнішньої групи використано *G. rigescens*.

Головні відмінності між видами пов'язані з частиною НТС, яка знаходиться між цими консервативними сайтами. У представників першої групи за сайтом термінації містяться

характерні лише для цих видів СТ-багата ділянка довжиною близько 80 п. н., за якою йде GC-багатий регіон приблизно такого ж розміру. Водночас у всіх представників другої групи, в

цій частині НТС знаходиться відносно консервативна ділянка, відсутня у видів першої групи, у складі якої виявлено послідовність довжиною 60 п. н. з високою гомологією до кодувальної частини гена 5S рРНК. Лише у *G. nivalis* вона відсутня за виключенням чотирьох початкових нуклеотидів. Саме тут знаходиться послідовність, гомологічна до використаного в цій роботі прямого праймера, що може бути причиною ампліфікації мінорних фрагментів розміром близько 300 та 800 п.н. *G. acaulis* та *G. nivalis* відрізняються від інших видів групи наявністю протяжних видоспецифічних ділянок (~124 та ~165 п. н., відповідно), розташованих одразу за сайтом термінації транскрипції на початку міжгенного спейсера, завдяки чому мають найдовші НТС (503 та 495 п. н.).

Із отриманої дендрограми, побудованої за алгоритмом Neighbour Joining на основі вирівнювання послідовності НТС гена 5S рРНК, видно, що види згрупувалися відповідно до визначених раніше секцій у межах роду (рис. 2). Єдиним винятком став *G. asclepiadea*, який не потрапив до одного кластера з іншими видами секції *Pneumonanthe* *G. triflora*, *G. scabra* і *G. manshurica*, а ділянка НТС якого за своєю організацією та послідовністю має значно більшу подібність до видів *G. acaulis* та *G. lutea*: 94 % та 97 % ідентичності, відповідно, на відміну від 87 % подібності із послідовностями трьох вищезгаданих видів. Тут слід зазначити, що рівень ідентичності для послідовностей НТС цих трьох видів між собою становить 98 %. Так само високим рівнем подібності характеризуються й

види з секції *Calathianae*, ідентичність послідовностей яких між собою становить не нижче 98 %. Винятком є *G. nivalis*, для якого цей показник становить 92 %.

Отримані дані свідчать також про те, що еволюція послідовності НТС гена 5S рРНК досліджених азійських та європейських видів роду відбувалася незалежно в різних напрямках упродовж тривалого періоду, наслідком чого стала значна їх дивергенція за цією ознакою. Крім того, у досліджених видів помічається тенденція до збільшення довжини міжгенного спейсера: лише в одного виду вона становить трохи більше 200 п. н., у решти – від 300 до 500 п. н.

Висновки

Досліджено поліморфізм міжгенного спейсера генів 5S рРНК видів роду *Gentiana*. Визначено нуклеотидну послідовність клонованих ПЛР-фрагментів НТС генів 5S рРНК трьох видів тирличів флори України. На основі порівняльного аналізу власних даних та послідовностей, наявних у GenBank, встановлено деякі особливості будови ділянки НТС генів 5S рРНК окремих представників роду.

Роботу проведено за часткової фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (2012–2016 рр.) в рамках виконання проекту «Структурна та функціональна геноміка для вивчення ряду проблем функціонування вірусів, бактерій та вищих еукаріот».

Література

1. Куприянова Н.С. Консервативность и изменчивость рибосомной ДНК эукариот // Молекулярная биология. – 2000. – Т. 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. – Т. 37, № 1. – С. 72–78.
3. Volkov R.A., Panchuk I.I., Borishuk N.V., Hosiawa-Baranska M., Maluszynska J., Hemleben V. Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna* // BMC Plant. Biol. – 2017. – V. 17, N1:21. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6.
4. Ho T.-N., Liu S.-W. The infrageneric classification of *Gentiana* (Gentianaceae) // Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.), Bot. – 1990. – V. 20, № 2. – P. 169–192.
5. Hammerli M. Molecular aspects in systematics of *Gentiana* Sect. *Calathianae* Froel. /. Theses for obtaining scient. degree of Dr. of Sci. – Neuchâtel, 2007. – 99 p. [Electronic resource]. – Mode of access: https://doc.rero.ch/record/8521/files/these_HaemmerliM.pdf.
6. Wong K.L., But P.H., Shaw P.C. Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal *Gentiana* species and their adulterants // Chinese medicine. – 2013. – V.8, N1:16. doi: 10.1186/1749-8546-8-16.
7. Rogers I., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biology. – 1985. – V. 5. – P. 69–76.
8. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. – 2012. – V. 28. – P. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.

ANDREEV I.O., MEL'NYK V.M., MYRYUTA G.Yu., KUNAKH V.A.

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

POLYMORPHISM OF 5S rDNA INTERGENIC SPACER IN SOME GENTIANA SPECIES

Aim. The aim was to determine the nucleotide sequence of non-transcribed spacer (NTS) of 5S rRNA genes in some *Gentiana* species of the Ukrainian flora and to study the organization of this region. **Methods.** DNA was isolated from leaf tissue. DNA isolation, PCR-analysis, and agarose gel electrophoresis were performed according to standard procedures. Isolated PCR-fragments were cloned and sequenced. DNA sequences were processed and aligned in Unipro UGENE software. **Results.** The size and nucleotide sequence of 5S rDNA NTS were determined for *G. acaulis*, *G. lutea*, and *G. asclepiadea*. On the basis of alignment and comparative analysis of 5S rDNA NTS of these and additional 11 gentians found in GenBank, two groups of species were identified, which differed significantly in the organization of this region. The first group included three East-Asian species of section *Pneumonanthe*, and the second included 7 species of section *Calathianae*, mainly from Europe, and three species studied here. The revealed peculiarities of the structure indicate the independent evolution of the NTS region in identified groups of the species. **Conclusions.** Nucleotide sequence of 5S rDNA NTS region was determined for three *Gentiana* species of Ukrainian flora. The features of the organization of the 5S rDNA NTS region are identified in European and Asian species of gentians.

Keywords: *Gentiana*, non-transcribed spacer, 5S rRNA genes, sequencing.