

Рестриктне картування генів рибосомної РНК представників роду *Nicotiana*

С. І. Комарницький

Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

Проведено рестриктне картування ядерної рибосомної ДНК 66 видів роду *Nicotiana*. Не знайдено відмінностей в розташуванні сайтів рестрикції для *EcoRI*, *BamHI*, *XbaI*, *DraI* і *EcoRV* у межах послідовностей, що кодують 18S, 5.8S і 26S рРНК. Результати дослідження числа і позицій рестриктних сайтів для ендонуклеаз рестрикції *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *DraI*, *HindIII*, *XbaI* у міжгенному спейсері *Nicotiana* загалом підтримують сучасний розподіл видів *Nicotiana* по секціях.

Вступ. *Nicotiana* є одним з п'яти великих родів родини пасльонових і включає біля 70 видів [1, 2], які поширені в обох Америках, Австралії і кількох островах Тихого океану. На додаток, *N. africana* є ендемічним видом в Африці [3]. Не враховуючи різної кількості хромосом [1–3], види роду сильно різняться між собою за розмірами [4], поширенням повторюваних послідовностей [5], різною кількістю поліпептидів малої субодиниці рибосоми [6].

Рибосомна ДНК організована тандемно. Кожний повтор містить кодуєчу ділянку (18S, 5.8S, 26S) рДНК і міжгенний спейсер [7]. Спейсерна послідовність, яка не транскрибується (міжгенний спейсер, МГС), характеризується високою гетерогенністю за нуклеотидним складом та довжиною і досить швидко еволюціонує [8]. Довжина рДНК повтору варіює в різних видів у межах від 8,0 у *Raphanus* [9] до 14–17 тис. п. н. у *Trillium* і *Paris* [10]. Організацію повторів рДНК серед видів *Nicotiana* вивчено недостатньо, а дані, наявні в літературі, є несистематичними [11–15]. Тому метою даної роботи було вивчення структурної організації рДНК видів роду *Nicotiana* для реконструкції еволюції генів рРНК в роді.

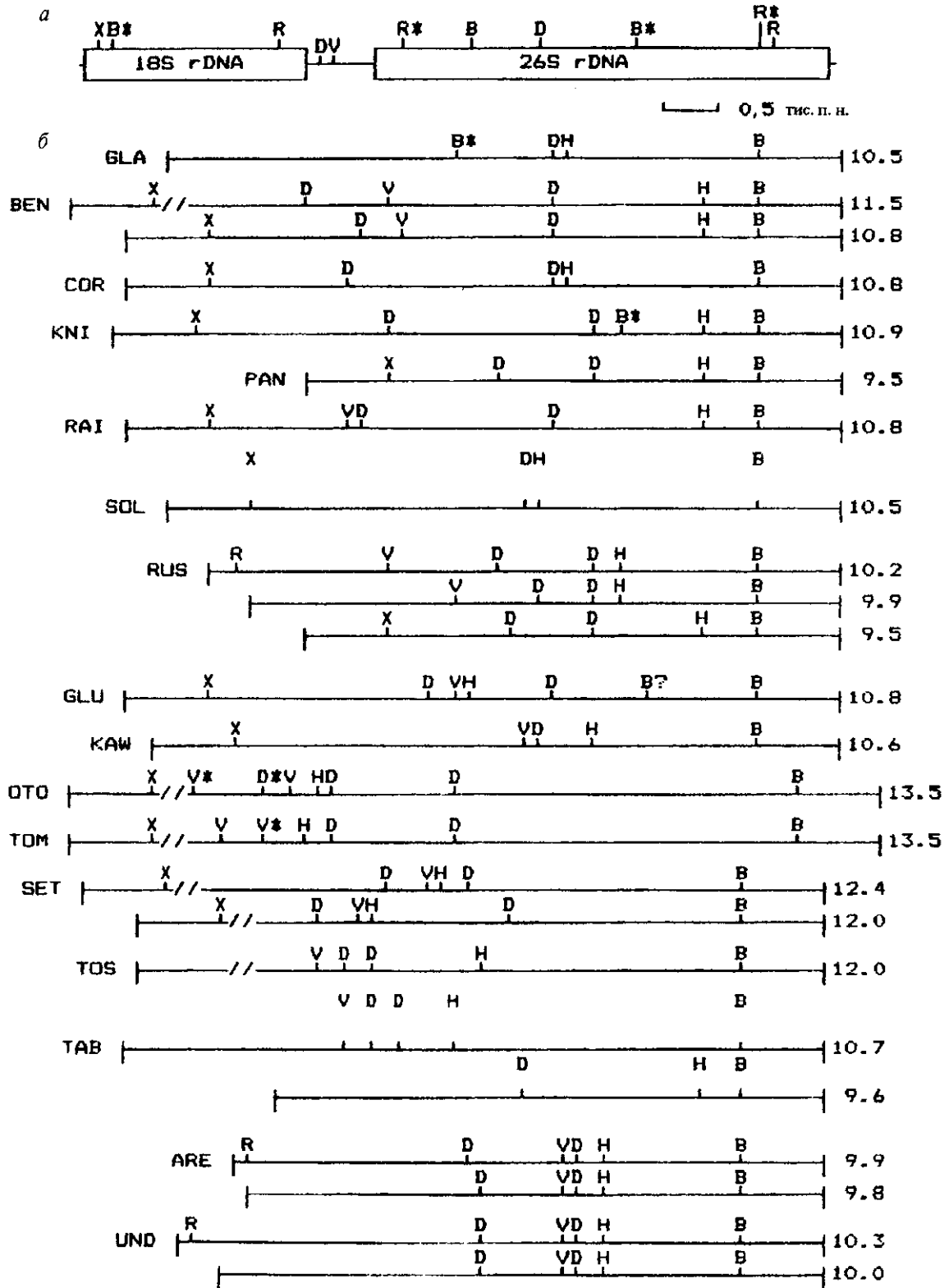
Матеріали і методи. Загальну ДНК виділяли з рослинного матеріалу (таблиця) згідно з процедурою, яку описано раніше [16]. Рестриктази *BamHI*, *XbaI*, *DraI*, *EcoRI*, *HindIII*, *EcoRV* отримано з фірми «Ферментас» (Литва). ДНК у кіль-

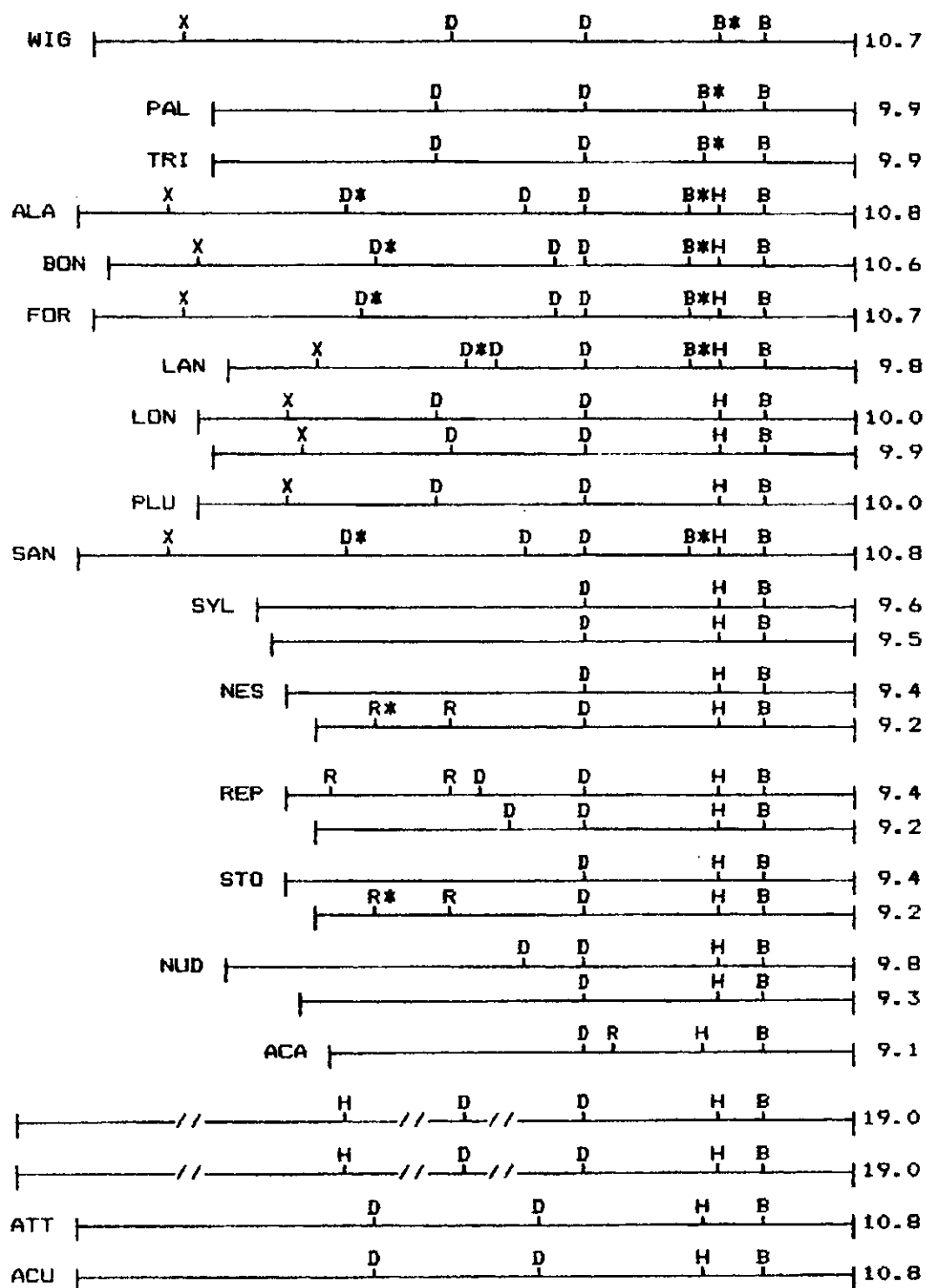
кості 1 мкг гідролізували згідно з інструкцією фірми. Після гідролізу ДНК рестриктні фрагменти розділяли в 0,8 %-му агарозному гелі і переносили їх на нейлонові фільтри лужним способом [17]. Фільтри гібридизували, як описано раніше [18]. Проби мітили, використовуючи метод розсіяної затравки [19]. У роботі використано проби *pUL7* [20] і *pTa71* [21]. Розміри гібридизаційних фрагментів визначали, як описано раніше [13]. Маркерами служили *HindIII*-рестриктні фрагменти ДНК фага лямбда.

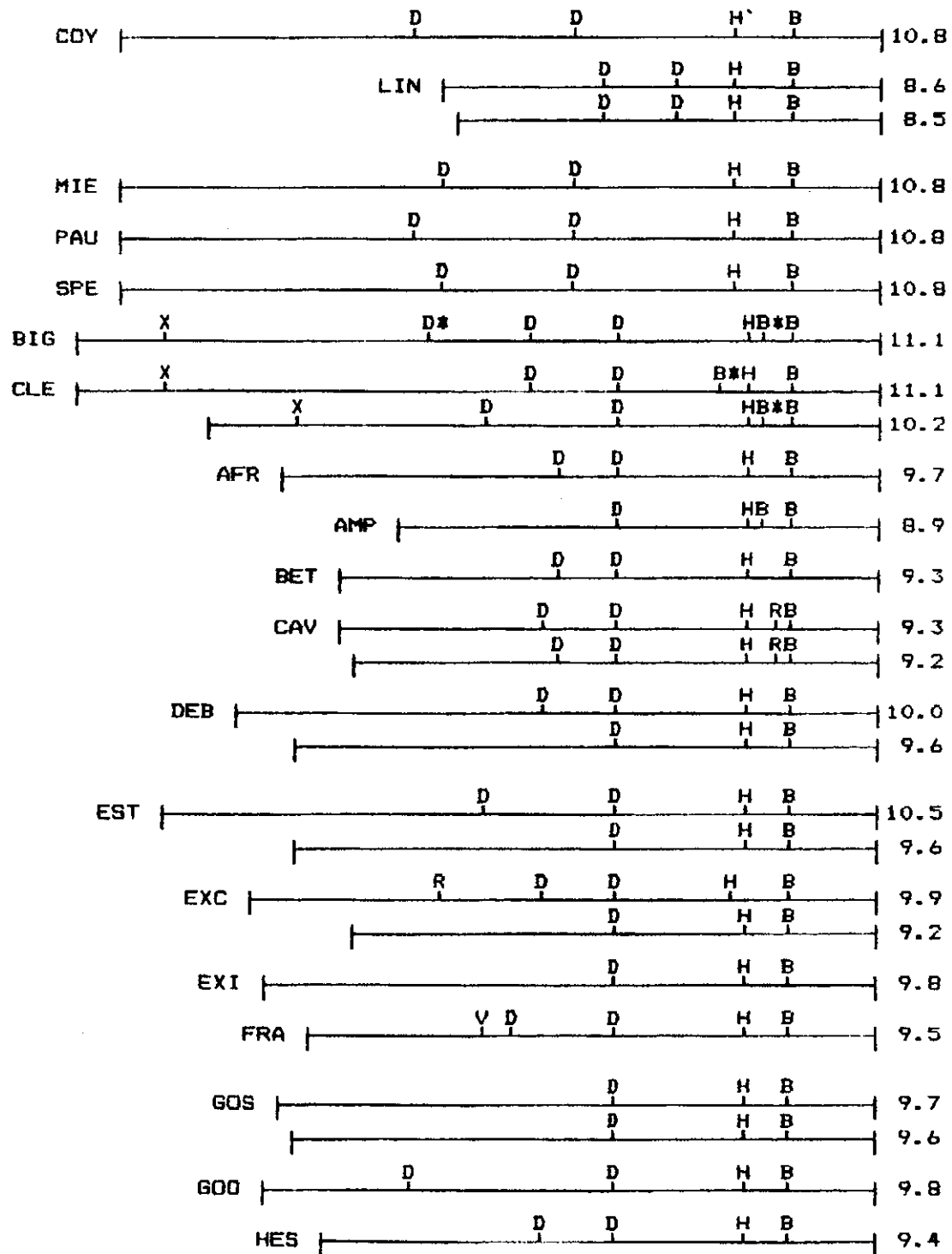
Результати і обговорення. Існують два головних параметри, важливість яких потрібно розуміти, приступаючи до характеристики такої системи, як родина пасльонових загалом та види роду *Nicotiana* зокрема — це довжини повторів рибосомних ДНК цих видів та локалізація варіабельної ділянки в межах самого повтору. Порівняння рестриктних карт 66 видів роду *Nicotiana* показало (рисунок), що довжини повторів рДНК цих видів змінюються в межах від 8,5 до 13,5 тис. п. н., за винятком *N. noctiflora* і *N. petunioides*, у яких довжина рДНК повтору сягала 19,0 тис. п. н. У той час як види одних секцій показали досить незначний рівень варіації довжини рДНК повтору (наприклад, види секції *Suaveolentes*, 8,9–10,5 тис. п. н.), представники інших секцій значно відрізнялися за розмірами повторів рДНК (наприклад, види секції *Tomentosae*, 10,6–13,5 тис. п. н.). Не знайдено жодних відмінностей в розташуванні сайтів рестрикції для *EcoRI*, *BamHI*, *XbaI*, *DraI* і

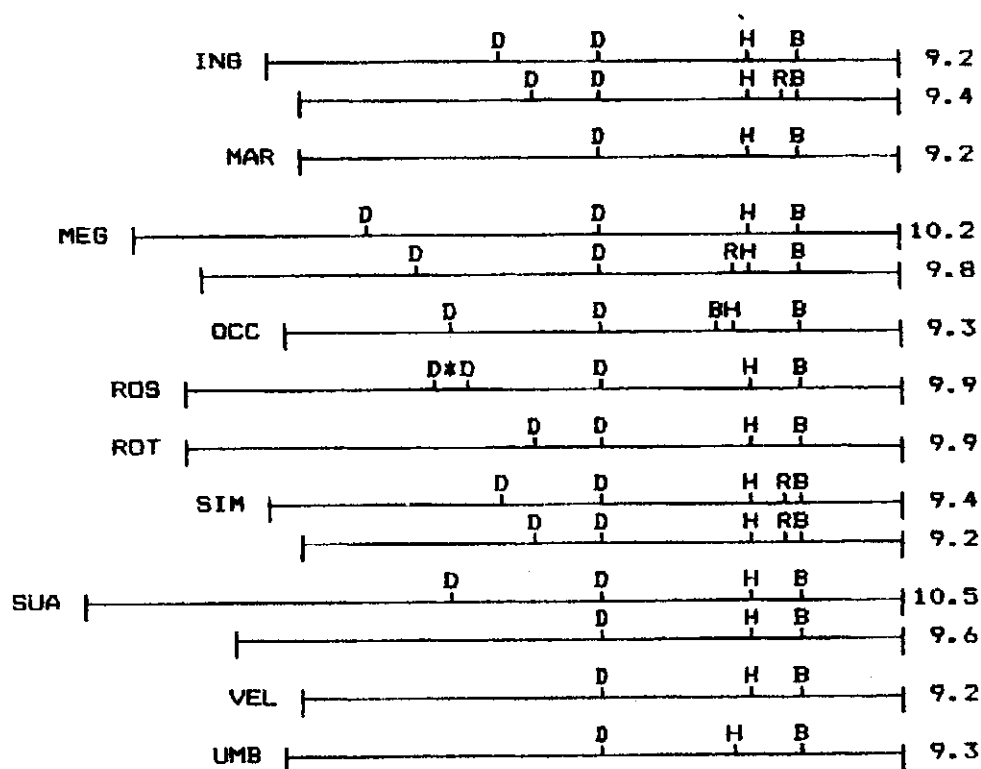
Характеристика видів роду *Nicotiana* [1, 2]

Підрід Секція Вид	Абревіатура для видів	Число хромосом	Підрід Секція Вид	Абревіатура для видів	Число хромосом
<i>Rustica</i>			<i>N. stocktonii</i>	(STO)	24
<i>Paniculatae</i>			<i>Noctiflorae</i>		
<i>N. benavidesii</i>	(BEN)	12	<i>N. acaulis</i>	(ACA)	12
<i>N. cordifolia</i>	(COR)	12	<i>N. noctiflora</i>	(NOC)	12
<i>N. glauca</i>	(GLA)	12	<i>N. petunioides</i>	(PET)	12
<i>N. khighlightiana</i>	(KNI)	12	<i>Acuminatae</i>		
<i>N. paniculata</i>	(PAN)	12	<i>N. acuminata</i>	(ACU)	12
<i>N. raimondii</i>	(RAI)	12	<i>N. attenuata</i>	(ATT)	12
<i>N. solanifolia</i>	(SOL)	12	<i>N. corymbosa</i>	(COY)	12
<i>Rusticae</i>			<i>N. linearis</i>	(LIN)	12
<i>N. rustica</i>	(RUS)	24	<i>N. miersii</i>	(MIE)	12
<i>Tabacum</i>			<i>N. pauciflora</i>	(PAU)	12
<i>Tomentosae</i>			<i>N. spegazzinii</i>	(SPE)	12
<i>N. glutinosa</i>	(GLU)	12	<i>Bigelovianae</i>		
<i>N. kawakamii</i>	(KAW)	12	<i>N. bigelovii</i>	(BIG)	24
<i>N. otophora</i>	(OTO)	12	<i>N. clevelandii</i>	(CLE)	24
<i>N. setchellii</i>	(SET)	12	<i>Nudicaules</i>		
<i>N. tomentosa</i>	(TOM)	12	<i>N. nudicaulis</i>	(NUD)	24
<i>N. tomentosiformis</i>	(TOS)	12	<i>Suaveolentes</i>		
<i>Genuinae</i>			<i>N. africana</i>	(AFR)	23
<i>N. tabacum</i>	(TAB)	24	<i>N. amplexicaulis</i>	(AMP)	18
<i>Petunioides</i>			<i>N. benthamiana</i>	(BET)	19
<i>Undulatae</i>			<i>N. cavicola</i>	(CAV)	23
<i>N. arentsii</i>	(ARE)	24	<i>N. debneyi</i>	(DEB)	24
<i>N. undulata</i>	(UND)	12	<i>N. eastii</i>	(EAS)	32
<i>N. wigandioides</i>	(WIG)	12	<i>N. excelsior</i>	(EXC)	19
<i>Trigonophyllae</i>			<i>N. exigua</i>	(EXI)	16
<i>N. palmeri</i>	(PAL)	12	<i>N. fragrans</i>	(FRA)	24
<i>N. trigonophylla</i>	(TRI)	12	<i>N. goodspeedii</i>	(GOO)	20
<i>Alatae</i>			<i>N. gossei</i>	(GOS)	18
<i>N. alata</i>	(ALA)	9	<i>N. hesperis</i>	(HES)	21
<i>N. bonariensis</i>	(BON)	9	<i>N. ingulba</i>	(ING)	20
<i>N. forgetiana</i>	(FOR)	9	<i>N. maritima</i>	(MAR)	16
<i>N. langsdorffii</i>	(LAN)	9	<i>N. megalosiphon</i>	(MEG)	20
<i>N. longiflora</i>	(LON)	10	<i>N. occidentalis</i>	(OCC)	21
<i>N. plumbaginifolia</i>	(PLU)	10	<i>N. rosulata</i>	(ROS)	20
<i>N. sanderae</i>	(SAN)	9	<i>N. rotundifolia</i>	(ROT)	22
<i>N. sylvestris</i>	(SYL)	12	<i>N. simulans</i>	(SIM)	20
<i>Repandae</i>			<i>N. suaveolens</i>	(SUA)	16
<i>N. nesophila</i>	(NES)	24	<i>N. umbratica</i>	(UMB)	23
<i>N. repanda</i>	(REP)	24	<i>N. velutina</i>	(VEL)	16









Рестриктні карти повторів рДНК видів роду *Nicotiana* (а) та розташування сайтів рестрикції в кодуючих ділянках однакове (б). Локалізація рестриктних сайтів у районі міжгенного спейсера. Аббревіатура для видів скорочена до трьох літер. Числа вказують довжину повтору рДНК у тис. п. н. R — *EcoRI*; V — *EcoRV*; H — *HindIII*; B — *BamHI*; D — *DraI*; X — *XbaI*. Частково метильовані рестриктні сайти позначено зірочкою

EcoRV рестриктаз у межах послідовностей, що кодують 18S, 5.8S і 26S рРНК у видів роду *Nicotiana*. З іншого боку, досліджені види роду *Nicotiana* досить сильно різняться як за послідовністю, так і за довжиною ділянки МГС. В окремих випадках сума розмірів гібридизаційних фрагментів значно перевищувала розмір повтору рДНК. За таких обставин припускалося часткове метилювання рестриктних сайтів або ж співіснування декількох класів повторів рДНК у межах одного індивідуума. Загалом, *BamHI*-сайт, що знаходився в МГС біля 5'-кінця 18S рДНК, був характерним для всіх видів роду *Nicotiana*. Інший досить консервативний *DraI*-сайт був картований в МГС більшості проаналізованих видів. Він, імовірно, локалізується в АТ-багатій ділянці МГС перед сайтом ініціації транскрипції, як це було показано для *Nicotiana* і *Solanum* [15, 22]. *XbaI*-сайт, локалізований правіше від 3'-кінця 26S рДНК, був типовим для видів

секції *Alatae* (за винятком *N. sylvestris*), *Bigelovianae*, *Tomentosae* (але не *N. tomentosiformis*) та *Paniculatae* (за винятком *N. glauca*). Майже жодних відмінностей не було знайдено в рестриктних картах видів секції *Acuminatae* (за винятком *N. linearis*). Рестриктні карти *N. palmeri* та *N. trigonophylla* були ідентичними, тоді як види секції *Repandae* характеризувалися наявністю двох *EcoRI*-сайтів поряд з 3'-кінцем 26S рДНК. *N. sanderiae*, що вважається гіпотетичним гібридом між *N. alata* і *N. forgetiana* [1], мав рестриктну карту, високогомологічну до рестриктних карт цих видів.

Серед видів секції *Suaveolentes* *N. suaveolens* і *N. eastii* мали ідентичні рестриктні карти рДНК. Додатковий *EcoRI*-сайт у МГС повтору рДНК був знайдений у *N. ingulba*, *N. simulans*, *N. cavicola*, *N. megalosiphon* і *N. excelsior*. З іншого боку, додатковий *EcoRV*-сайт є присутнім в МГС *N. fragrans*, на відміну від інших видів секції *Suaveolentes*, проте

деякі представники американських секцій роду (*Tomentosae*, *Paniculatae* і *Undulatae*) теж характеризувалися наявністю додаткового *EcoRV*-сайта в МГС.

Більшість видів роду *Nicotiana* показали присутність *HindIII*-сайта в МГС на 300 п. н. лівіше від *BamHI*-сайта, розташованого біля 5'-кінця 18S рДНК (наприклад, *N. repanda*, *N. bigelovii*, *N. stocktonii*), однак у деяких видів він був локалізований в інших ділянках МГС (наприклад, *N. cordifolia*, *N. benavidesii*) або навіть взагалі був відсутнім (зокрема, *N. palmeri*, *N. trigonophylla*, *N. wigandioides*). Обробка рестриктазою *DraI* виявляла від одного до трьох рестриктних сайтів *pTa71* для цієї рестриктази в МГС у залежності від виду. Ще одною цікавою рисою була відсутність *DraI* рестриктного сайту в ділянці ВТС-1 деяких видів. Відсутність цього сайту у видів *N. noctiflora* і *N. petunioides* (-ТТТААГ-) була підтверджена встановленням первинної структури цієї ділянки [23].

Число та відносне розташування рестриктних сайтів, у першу чергу, в ділянці МГС дозволили реконструювати філогенію повторів рДНК у межах роду *Nicotiana*. Серед семи видів, віднесених до секції *Paniculatae*, два (*N. glauca* і *N. solanifolia*) розглядалися Гудспідом [1] як маргінальні. Обидва вони разом з *N. cordifolia* мали зміщене розташування *HindIII*-сайта в МГС у порівнянні з іншими видами секції. Поряд з цим *N. glauca*, географічно віддалений від інших видів секції вид, який має дуже відмінний від інших каріотип [1], містить унікальний частково метильований *BamHI*-сайт в МГС та не включає *XbaI*-сайта, характерного для решти видів підродів *Rustica* і *Tabacum*, за винятком *N. tomentosiformis* і *N. tabacum*. *N. rustica*, ймовірно, є більш недавнім амфідиплоїдом між *N. paniculata* і *N. undulata* [1, 24]. Легко помітити, що один з його класів рДНК з *XbaI*-сайтом походить від *N. paniculata*. Коварік та співавт. [25] стверджують відсутність батьківських повторів рДНК у геномі *N. tabacum*, які б відповідали таким *N. sylvestris*, *N. tomentosiformis* чи *N. otophora*. Як відомо, культурний тютюн сьогодні не існує в дикому стані і вважається похідним від міжвидової гібридизації між *N. sylvestris* та *N. tomentosiformis* [26] чи *N. sylvestris* і інтрогресивного гібриду *N. tomentosiformis*/*N. otophora* [27]. Однак у даному дослідженні більший клас рДНК *N. tabacum*, що не має *XbaI*-сайта, подібний до такого *N. tomentosiformis*, а менший — нагадує (він характеризується лише незначною зміною в положенні *DraI*-сайта) один з класів рДНК *N. sylvestris*. *N. arentsii*, постульований як похідний від гібридизації між *N. undulata* і *N. wigandioides* [1,

24], містить два класи рДНК повторів, що нагадують повтори рДНК *N. undulata*, але не *N. wigandioides*.

Усі види секції *Alatae* містили характерний *XbaI*-сайт у МГС (за винятком *N. sylvestris*). Присутність частково метильованого *BamHI*-сайта поряд з іншим *BamHI*-сайтом біля 5'-кінця 18S рДНК дозволила виділити підмножину видів секції *Alatae*. Всі вони (*N. alata*, *N. forgetiana*, *N. bonariensis*, *N. sanderae* та *N. langsdorffii*) мають однакове гаплоїдне число хромосом ($n=9$), тоді як *N. plumbaginifolia* і *N. longiflora* ($n=10$) складають іншу групу секції [1].

На завершення слід додати, що рестриктні карти рДНК кількох видів не збігалися з такими, які описані раніше [15]. Не виключено, що однією з причин цього є міжвидовий поліморфізм міжгенної послідовності, який відбиває алейну гетерогенність за даною ознакою. Серед вищих рослин зустрічаються види, у яких описано подібний поліморфізм. До таких видів належать ячмінь [28], пшениця [29], цукровий буряк [30], просо [31].

S. I. Komarnytsky

Restriction enzyme mapping of the ribosomal RNA genes of the genus *Nicotiana*

Summary

The organization of the nuclear-encoded ribosomal RNA genes of 66 species of the genus *Nicotiana* was analysed by restriction enzyme mapping. We have not found any differences in the position of restriction enzyme sites within the sequences coding for 18S, 5.8S, and 26S rRNAs. The investigation of the number and relative position of cleavage sites for restriction endonucleases (*EcoRI*, *BamHI*, *XbaI*, *EcoRV*, *HindIII*, *DraI*) in the 1GS regions of *Nicotiana* in general confirmed the modern division of *Nicotiana* species into sections.

С. И. Комарницкий

Рестриктное картирование рибосомной ДНК рода *Nicotiana*

Резюме

Проведено рестриктное картирование ядерной рибосомной ДНК 66 видов рода *Nicotiana*. Не найдены отличия в расположении сайтов рестрикции в границах последовательностей, кодирующих 18S, 5.8S и 26S рРНК. Результаты исследования числа и позиций рестриктных сайтов для эндонуклеаз рестрикции (*EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *DraI*, *HindIII*, *XbaI*) в межгенном спейсере *Nicotiana* в общем поддерживают современное распределение видов *Nicotiana* по секциям.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Goodspeed T. H. The genus *Nicotiana*.—Massachusetts: Waltham, 1954.—536 p.
2. Burbidge N. T. The Australian species of *Nicotiana* L. (*Solanaceae*) // Aust. J. Bot.—1960.—8.—P. 342—395.
3. Merxmüller H., Buttler K. P. *Nicotiana* in der Afrikanischen Namibien Pflanzengeographisches und Phylogenetisches Ratsel // Mitt. Bot. München.—1975.—12.—P. 91—104.

4. Narajan R. K. L. Nuclear DNA changes, genome differentiation and evolution in *Nicotiana* // *Plant Syst. Evol.*—1987.—157.—P. 161—180.
5. Koukalova B., Komarnitsky I., Kuhrova V. The distribution of tobacco HRS60 repeated sequences in species of the genus *Nicotiana* // *Plant Sci.*—1993.—88.—P. 39—44.
6. Chen K., Johal S., Wildman S. G. Role of chloroplast and nuclear DNA genes during evolution of fraction I protein / Eds T. Bucher, W. Neupert, W. Sebald, S. Werner // *Genetic and Biogenesis of chloroplast and mitochondria.*—Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier, 1976.—P. 3—11.
7. Long E. O., Dawid I. B. Repeated genes in eukaryotes // *Annu. Rev. Biochem.*—1980.—43.—P. 727—764.
8. Hemleben V., Ganai M., Gerstner J., Schiebel K., Torres R. A. Organization and length heterogeneity of plant ribosomal RNA genes // *The architecture of Eukaryotic Genes* / Ed. G. Kahl.—Weinheim: VHC, 1988.—P. 371—384.
9. Delseny M., Cooker R., Penon P. Sequence heterogeneity in radish nuclear ribosomal RNA genes // *Plant Sci. Lett.*—1983.—30.—P. 107—119.
10. Yakura K., Kato A., Tanfuji S. Structural organization of ribosomal DNA in four *Trillium* species and *Paris verticillata* // *Plant Cell Physiol.*—1983.—24.—P. 1231—1240.
11. Борисюк Н. В., Костышин С. С., Волков Р. А., Мирошніченко Г. П. Стрoение генов рибосомальних РНК у вищихих рослин из рода *Nicotiana* // *Молекуляр. биология.*—1989.—23, № 4.—С. 1067—1074.
12. Волков Р. А., Борисюк Н. В., Костышин С. С., Панчук И. И. Изменчивость генов рРНК при перестройках хромосомного аппарата у табаков // *Молекуляр. биология.*—1991.—25.—С. 442—450.
13. Комарницький І., Комарницький С. Поліморфізм довжин рестриктних фрагментів міжгенного спейсеру рибосомальної ДНК деяких видів тютюнів // *Цитологія і генетика.*—1996.—30, № 1.—С. 65—71.
14. Комарницький І., Комарницький С. Варіабельність міжгенного спейсеру рибосомальних ДНК американських видів тютюну // *Цитологія і генетика.*—1996.—31, № 2.—С. 29—36.
15. Borisjuk N. V., Davidjuk Y. M., Kostishin S. S., Miroshnichenko G. P., Velasco R., Hemleben V., Volkov R. A. Structural analysis of rDNA in the genus *Nicotiana* // *Plant Mol. Biol.*—1997.—35.—P. 655—660.
16. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucl. Acids Res.*—1980.—8.—P. 4321—4325.
17. Reed K. S., Mann D. A. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes // *Nucl. Acids Res.*—1985.—13.—P. 7207—7221.
18. Church G. M., Gilbert W. Genomic sequencing // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81.—P. 1991—1995.
19. Feinberg A., Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity // *Anal. Biochem.*—1983.—132.—P. 6—13.
20. Колоша В. О., Фодор М. И. Структурная гетерогенность рДНК *Cytrus lemon* // *Молекуляр. биология.*—1986.—20.—P. 556—662.
21. Gerlach W. R., Bedbrook J. R. Cloning and characterization ribosomal RNA genes // *Nucl. Acids Res.*—1979.—7.—P. 1868—1885.
22. Borisjuk N., Borisjuk L., Petjuch G., Hemleben V. Comparison of ribosomal RNA genes within *Solanum* and other *Solanaceae* // *Genome.*—1994.—37.—P. 271—280.
23. Комарницький С. І., Комарницький І. К., Кокс А., Пароконний О. С. Еволюція послідовностей внутрішнього транскрибуючого спейсера ядерної рибосомальної ДНК американських видів роду *Nicotiana* // *Цитологія і генетика.*—1998.—32, № 3.—С. 69—76.
24. Gray J. C. Serological reaction of fraction I proteins from interspecific hybrids in the genus *Nicotiana* // *Plant Syst. Evolut.*—1978.—129.—P. 177—183.
25. Kovaric E., Fajkus J., Koukalova B., Bezdek M. Species-specific evolution of the telomeric and rDNA repeats in the tobacco composite genome // *Theor. and Appl. Genet.*—1996.—92.—P. 1108—1111.
26. Gray J. C., Kung S. D., Wildman S. G., Sheen S. J. Origin of *Nicotiana tabacum* detected by polypeptide composition of fraction I protein // *Nature.*—1974.—252.—P. 226—227.
27. Kenton A., Parokony A. S., Gleba Y. Y., Bennet M. D. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics // *Mol. and Gen. Genet.*—1993.—20.—P. 556—662.
28. Saghayy-Marooif M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81.—P. 8014—8018.
29. Appels R., Dvorak J. The wheat ribosomal DNA spacer region: its structure and variation in population and among species // *Theor. and Appl. Genet.*—1982.—63.—P. 337—348.
30. Santoni S., Berville A. Characterization of the nuclear ribosomal DNA units and phylogeny of Beta L wild forms and cultivated beets // *Theor. and Appl. Genet.*—1992.—83.—P. 533—542.
31. Hilu K. W., Johnson J. L. Ribosomal gene variation in finger millet and wild species of *Elysiaceae* // *Theor. and Appl. Genet.*—1992.—83.—P. 895—902.

УДК 577.113:633.71

Надійшла до редакції 24.04.2000