

9. Маннатиш Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
10. Moire A., Brammer W. J. The use of specialized transducing phages in the amplification of enzyme production // Mol. and Gen. Genet.— 1976.— 149, N 1.— P. 87—99.
11. Суперсинтез  $\beta$ -галактозидазы, индуцированный некоторыми амбер-мутантами фага  $\lambda$ plac5c1857 / Л. Г. Глушакова, С. И. Черных, Л. Н. Стельмашенко, В. А. Кордюм // Молекуляр. биология.— 1982.— Вып. 30.— С. 37—41.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 06.02.89

УДК 575.113.1:581.143.6

В. Т. Соловьян, О. В. Захленюк, В. А. Кунах

### ПЕРЕСТРОЙКИ ГЕНОМА РАУВОЛЬФИИ В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO

Проведено сравнительное изучение геномов интактного растения и культивируемых клеток раувольфии. Методом дот-гибридизации показано отсутствие значительных геномных перестроек в непродолжительно культивируемых каллусах *R. serpentina* и *R. verticillata*, в то время как геном длительно пассируемых клеток *R. serpentina* претерпевает значительные изменения.

Рестрикционным анализом выявлено наличие геномных перестроек как в первичных каллусах *R. serpentina* и *R. verticillata*, так и в длительно пассируемых клетках *R. serpentina*.

Заключено, что геномные перестройки могут происходить на ранних этапах культивирования, однако процесс пассирования in vitro приводит к более значительным изменениям генома.

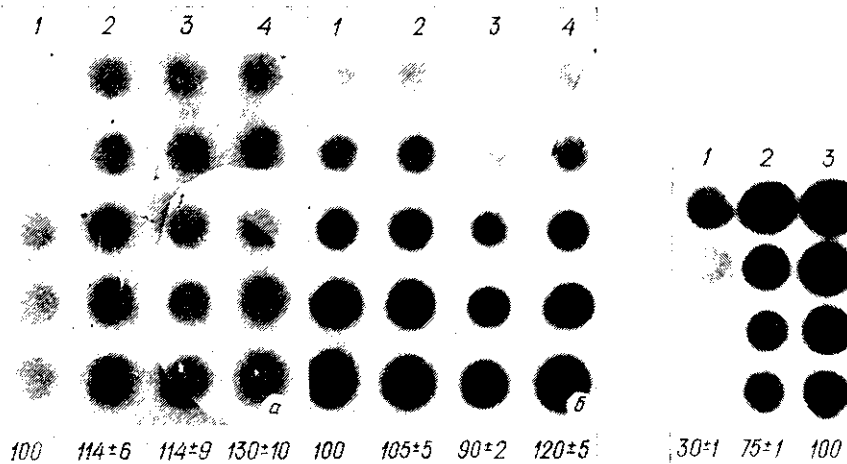


Рис. 1. Дот-гибридизация  $^{32}\text{P}$ -меченных частей (а) и умеренных (б) повторов линии *R. v.-1.5* с суммарной ДНК растения и каллусов *R. verticillata*: ДНК интактного растения (1); ДНК первичного каллуса (2); ДНК линии *R. v.-1.0*, культивируемой in vitro 1 год (3); ДНК линии *R. v.-1.5*. Цифры внизу — средний процент гомологии, вычисленный по результатам четырех опытов

Fig. 1. Dot hybridization of  $^{32}\text{P}$ -labeled highly (a) and middle (b) repeated sequences from line *R. v.-1.5* with total DNAs from plant and calli of *R. verticillata*: DNA from intact plant (1); DNA from primary callus (2); DNA from line *R. v.-1.0* cultivated for 1 year (3); DNA from line *R. v.-1.5* cultivated for 1.5 year (4). Figures below are the sequence homology percentages average of the four determinations

Рис. 2. Дот-гибридизация  $^{32}\text{P}$ -меченных повторяющихся последовательностей (Cot до 100) первичного каллуса с суммарной ДНК растения и каллусов *R. serpentina*: ДНК длительно пассируемой линии *R. serpentina* (1); ДНК первичного каллуса (2); ДНК интактного растения (3). Цифры внизу — средний процент гомологии повторов, вычисленный по результатам четырех опытов

Fig. 2. Dot hybridization of  $^{32}\text{P}$ -labeled primary callus repeated sequences (Cot up to 100) with total DNAs from plant and calli of *R. serpentina*: DNA from long cultivated *R. serpentina* line (1); DNA from primary callus (2); DNA from intact plant (3). Figures below are the sequence homology percentages average of the four determinations

Ранее нами показано, что повторяющиеся последовательности генома клеточных линий раувольфии, культивируемых *in vitro* продолжительное время, обнаруживают низкую степень гомологии с суммарной ДНК интактного растения [1, 2]. Это свидетельствует

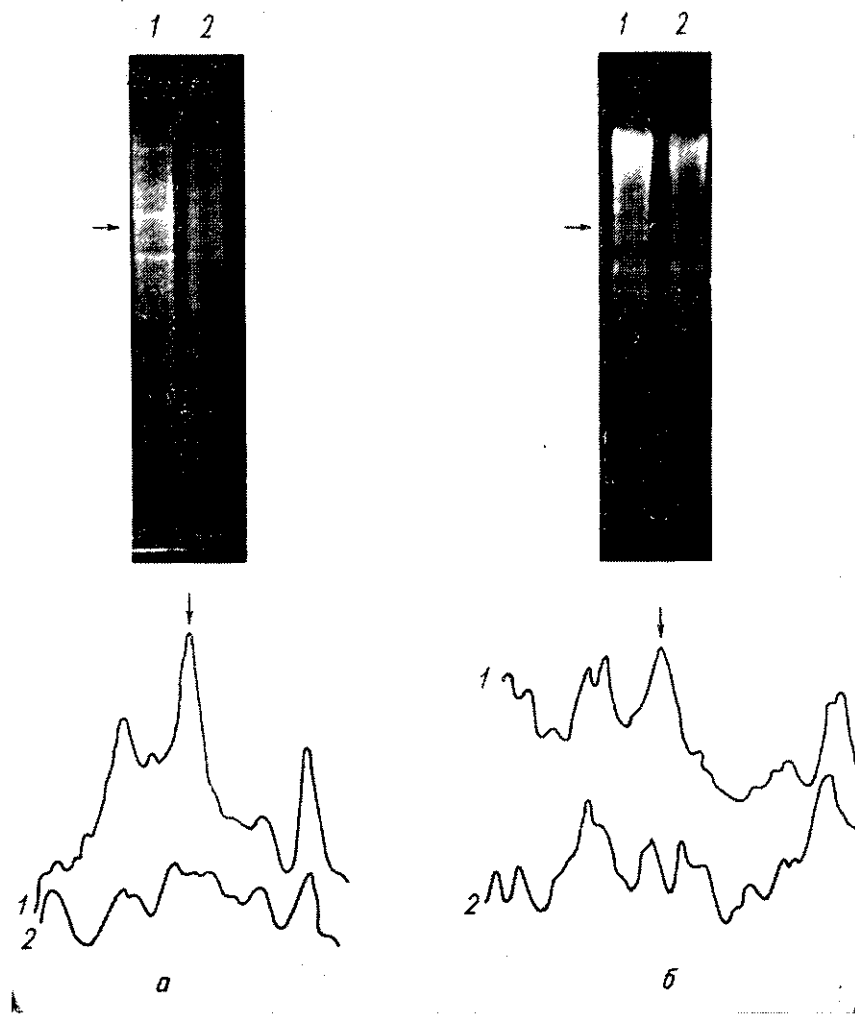


Рис. 3. Рестрикционный анализ суммарных ДНК интактного растения (1) и первичных каллусов (2) раувольфии: а — геле-электрофорез и фрагмент денситограммы *EcoRI*-перевара ДНК *R. serpentina*; б — геле-электрофорез и фрагмент денситограммы *HindIII*-перевара ДНК *R. verticillata*. Стрелками обозначены изменения в профиле рестрикции

Fig. 3 Restriction analysis of total DNAs from intact plant (1) and primary calli (2) of rauwolfia: a — gel-electrophoresis and densitometric tracing fragments of *EcoRI* digest of *R. serpentina* DNA, б — gel-electrophoresis and densitometric tracing fragments of *HindIII* digest of *R. verticillata* DNA. Arrows indicate restriction profile alterations

о значительных перестройках генома длительно пассируемых клеточных линий и может быть связано с амплификацией или интенсивной дивергенцией повторов.

В настоящем исследовании мы попытались выяснить, являются ли подобные перестройки следствием перевода растительных клеток в культуру или возникают в результате пассирования клеток на искусственной среде.

Для этой цели мы провели оценку степени гомологии повторяющихся последовательностей генома интактного растения и непродолжительно культивируемых каллусных тканей *R. serpentina* и *R. verticillata*. ДНК из растения и каллусов, фракции частых (Cot до 0,1) и умеренных повторов (Cot от 0,1 до 100) выделяли, как описано ранее [1]. Фракцию повторов первичного каллуса *R. serpentina* и каллусной линии *R. verticillata*, культивируемой *in vitro* 1,5 года (линия *R.v-1,5*), метили  $^{32}\text{P}$ -dCTP в

реакции нук-трансляции в условиях, рекомендуемых фирмой «Amersham» (Англия): дот-гибридизацию проводили по [3]. Рестрикцию суммарных препаратов ДНК растения и каллусов раувольфии осуществляли в условиях, описанных в [4]. Рестрикционные фрагменты разделяли электрофорезом в 0,8 %-ном агарозном геле в течение 12 ч при градиенте напряжения 2 В/см.

Из рис. 1 следует, что повторяющиеся последовательности генома непродолжительно культивируемых клеточных линий *R. verticillata* не обнаруживают значительных отличий в гомологии с ДНК интактного растения. Повторы генома первичного каллуса *R. serpentina*, как видно из рис. 2, обладают относительно высокой степенью гомологии с ДНК интактного растения и низкой — с ДНК длительно пассируемой (свыше 20 лет) линией.

Эти данные указывают на отсутствие значительных изменений фракции повторяющихся последовательностей генома первичных каллусов и непродолжительно культивируемых клеточных линий раувольфии. В то же время рестрикционный анализ ДНК интактного растения и каллусов показал, что перестройки генома как *R. serpentina*, так и *R. verticillata* могут иметь место на стадии первичного

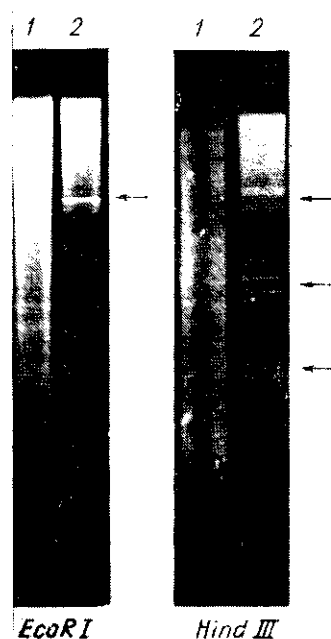


Рис. 4. Рестрикционный анализ суммарных ДНК интактного растения (1) и длительно пассируемой (2) клеточной линии *R. serpentina*. Стрелками обозначены изменения в профиле рестрикции

Fig. 4. Restriction analysis of total DNAs from intact plant (1) and long cultivated (2) *R. serpentina* cell line. Arrows indicate restriction profile alterations

каллуса (рис. 3). Геном длительно пассируемой клеточной линии *R. serpentina* обнаруживает при этом более значительные перестройки (рис. 4).

Приведенные данные показывают, что геномные перестройки в культивируемых клетках раувольфии могут происходить на стадии первичного каллуса, однако процесс пассирования *in vitro* приводит к более существенным изменениям генома.

#### RAUWOLFIA GENOME REARRANGEMENTS DURING CULTURING IN VITRO

V. T. Solovjan, O. V. Zakhlenjuk, V. A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

Intact Rauwolfia plant and cultivated cell genomes have been comparatively studied. The dot hybridization analysis has shown that there are significant genome rearrangements for *R. serpentina* callus cultivated for a long time rather than for *R. serpentina* and *R. verticillata* calluses cultured for a short time.

Restriction analysis has revealed the genome rearrangements both in the primary calluses of *R. serpentina* and *R. verticillata* and in the long subcultured *R. serpentina* cells.

It is concluded that genome rearrangements can occur at the early stages of cultivation, but the process of subsequent subculturing *in vitro* leads to more significant changes in genome.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сравнение степени гомологии ДНК и количества повторяющихся последовательностей у интактного растения и культивируемых клеток *Rauwolfia serpentina* Benth. / В. Т. Соловьян, В. А. Кунах, В. Вершинин, В. К. Шумный // Докл. АН СССР. — 1986. — 287, № 4. — С. 998—1000.

2. Соловьян В. Т., Костенюк И. А., Кунах В. А. Изменения генома культивируемых *in vitro* клеток раувольфии змеиной // Генетика.— 1987.— 23, № 7.— С. 1200—1208.
3. *Nucleic acid hybridization. A practical approach* / Eds B. D. Hames, S. J. Higgins.— New York: LRL press, 1986.— 225 p.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 05.06.89

Окончание. Начало см. на с. 88—90.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schlesinger M. J., Kelly P. M., Miperti G. Properties of three major heat shock proteins and their antibodies // Heat shock from bacteria to man.— New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982.— P. 243—246.
2. Goldschmidt-Clermont M. E. Two genes for the major heat shock proteins of *Drosophila melanogaster* arranged as inverted repeat // Nucl. Acids Res.— 1980.— 8, N 2.— P. 235—252.
3. Craig E. A., McCarthy B. J., Wadsworth S. C. Sequence organization of two recombinant plasmids containing genes for the major heat shock induced protein of *Drosophila melanogaster* // Cell.— 1979.— 60, N 2.— P. 575—581.
4. Peiham H. R. B. A regulatory upstream promoter element in *Drosophila* Hsp70+heat shock gene // Ibid.— 1982.— 30, N 2.— P. 517—528.
5. High-level heat-regulated synthesis of proteins in eukaryotic cells / M. Dreano, J. Brochot, A. Myers et al. // Gene.— 1986.— 49, N 1.— P. 1—8.
6. Interferon production under the control of heterologous inducible enhancers and promoters / A. Masahite, N. Hitoshi, I. Yoichiro et al. // Microbiol. and Immunol.— 1988.— 32, N 6.— P. 589—596.
7. Исследование возможности экспрессии экзогенного гена инсулина человека в культивируемых фибробластах млекопитающих / Л. Н. Неборачко, Л. Л. Лукаш, Б. М. Трояновский и др. // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 2.— С. 58—61.
8. An G., Hidaka K., Siminovitich L. Expression of bacterial  $\beta$ -galactosidase in animal cells // Mol. and Cell. Biol.— 1982.— 2, N 12.— P. 1628—1632.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 24.07.89