

Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей 5.8S ядерної рибосомної ДНК 30 видів рослин

С. І. Комарницький

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

Здійснено порівняльний аналіз первинної структури 5.8S рДНК 30 видів рослин, у тому числі моху, папороті, двох голонасінних і 26 покритонасінних видів. 36,8 % потенційно філогенетично інформативних позицій локалізуються у трьох дискретних ділянках молекули. На основі цих даних окреслено основні родинні зв'язки у рослин.

Вступ. Філогенетичні зв'язки між основними групами рослин залишаються досить нечіткими і на сьогодні, хоча ця тема широко обговорюється в літературі [1—4]. Вагомий внесок у висвітлення цього питання може дати вивчення первинної структури різноманітних макромолекул, причому у більшості випадків дані, отримані на основі рРНК, є значно інформативнішими для реконструкції родинних зв'язків у рослин порівняно з такими для первинної структури білків [5]. Гіпотезу універсальності «молекулярного годинника» було визнано щонайбільше як правило з багатьма винятками [6, 7], а генетичні тексти набувають все ширшого застосування у реконструкції філогенії рослин [8—15]. До недавнього часу нуклеотидні послідовності 5.8S рДНК були визначені у невеликого числа видів, і тому спроби їх порівняльного аналізу являли собою досить рідке явище [15—17]. Проте на сьогодні опубліковано первинну структуру 5.8S рДНК у складі внутрішнього транскрибуючого спейсера (ВТС) багатьох рослин [8—11, 15—23]. Як відомо, ген 5.8S рРНК висококонсервативний за довжиною, однак містить у своєму складі декілька варіабельних ділянок [16, 18].

На основі первинної структури 5.8S рДНК та/чи послідовностей ВТС1 і ВТС2 було реконструйовано філогенетичні зв'язки в деяких родинях (підродинах, родах), а також показано повне узгодження отриманих висновків з такими, зробленими в результаті дослідження морфології, цитогенети-

ки, рестриктоного аналізу хлоропластної ДНК цих видів [8—13].

У зв'язку з вищевикладеним до порівняльного аналізу 5.8S рДНК рослин було залучено визначену нами раніше первинну структуру 5.8S рДНК шести видів родини *Solanaceae* [24] та 24 інших рослин, серед яких є представники мохів, папоротей, голонасінних та шести центральних родин покритонасінних. Наслідком цього аналізу було безкореневе філогенетичне дерево, реконструйоване на основі потенційно філогенетично інформативних нуклеотидних позицій 5.8S рДНК.

Матеріали та методи. В даному дослідженні було використано первинну структуру 5.8S рДНК шести видів родини *Solanaceae*, а саме: тютюну *Nicotiana plumbaginifolia*, цеструма *Cestrum parqui*, дерези *Lycium turcomanium*, дурману *Hyoscyamus albus*, красавки *Atropa belladonna* і мандрагори *Mandragora species* [24] та 24 інших рослин: листяного моху *Mnium rugicum* D [25], папороті *Marsilia quadrifolia* [16], голонасінних ефедри *Ephedra kokanika* [16] і смереки *Picea excelsa* [15], представників родин бобових — люпіну *Lupinus luteus*, бобу *Vicia faba* [17], квасолі *Vigna radiata* [22], складноцвітих — арніки *Arnica mollis*, дубаутії *Dubautia arborea*, мадії *Madia bolanderi* [11], вербових — тополі *Populus deltoides* [18], хрестоцвітих — гірчиці *Sinapis albus* [27] і арабідопсиса *Arabidopsis thaliana* [26], гарбузових — дині *Cucumis melo* [19], злакових — рису *Oryza sativa* [23], вівса *Avena longiglumis*, перлівки *Melica imperfecta*, костриці *Festuca mairei*, стоколоса *Bromus tectorum*,

грястиці *Dactylis glomerata*, житняка *Agropyron cristatum* [9], пшениці *Triticum vulgare* [17], жита *Secale cereale* та ячменю *Hordeum vulgare* [10]. Послідовності 5.8S рДНК моху, папороті, ефедри, смереки, бобу і пшениці виведено за первинною структурою їх 5.8S рРНК.

Послідовності 5.8S рДНК вищезгаданих рослин вирівнювали за допомогою програми CLUSTAL V [28] (мал. 1). Вирівняні послідовності далі було використано в програмі DNADIST для прямого попарного підрахування філогенетичних відстаней між видами згідно двопараметричної моделі Кімури. Отримана матриця слугувала вихідною базою даних для програми побудови безкореневих

філогенетичних дерев NEIGHBOR, яка не спирається на принцип «молекулярного годинника». Дві останні програми походять з пакету PHYLIP (версія 3.5) [29]. Первинну структуру 5.8S рДНК моху як найпримітивнішу серед досліджуваних було використано як поляризатор.

Результати і обговорення. Загальна довжина 5.8S рДНК досліджуваних видів змінювалася в досить широких межах. Так, якщо для моху, папороті, ефедри та смереки це число становило 157, 155, 161, 162 пари нуклеотидів (п. н.) відповідно, то для решти видів воно не виходило за межі 163—165 п. н. 5.8S рДНК переважної більшості видів мала довжину 164 п. н.

50.

1. <i>Mnium</i>	---ATAACCCCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTTGCAACGATGAAGAACG
2. <i>Marsilia</i>GG..T.....
3. <i>Ephedra</i>	CTT.C...T...G...T.....C.....C...T.....
4. <i>Piceu</i>	TAA..G..T...G.....C.....-.....
5. <i>Orysa</i>	CAC.CG..T...G.....C.....C...T.....
6. <i>Avena</i>	CAC.CG..T...G.....C.....C...T.....
7. <i>Melica</i>	CAC.CG..T...G.....C.....C...T.....
8. <i>Agropyron</i>	AAC.CG..T...G.....C.....C...T.....
9. <i>Bromus</i>	CAC.CG..T...G.....C.....C...T.....
10. <i>Dactylis</i>	CAC.CG..T...G.....C.....C...T.....
11. <i>Festuca</i>	CAC.CG..T...G.....C.....C...T.....
12. <i>Hordeum</i>	CAC.CG..T...G.....C.....C...T.....
13. <i>Secale</i>	CAC.CG..T...G.....C.....C...T.....
14. <i>Triticum</i>	CAC.CG..T...G.....C.....C...T.....
15. <i>Arnica</i>	TAA.CG..T...G.....C.....AC...T.....
16. <i>Dubautia</i>	TAA.CG..T...G.....C.....AC...T.....
17. <i>Madia</i>	TAA.CG..T...G.....C.....AC...T.....
18. <i>Cestrum</i>	GAA.CG..T...G.....C.....C...T.....
19. <i>Nicotiana</i>	CAA.CG..T...G.....C.....C...T.....
20. <i>Atropa</i>	GAA..G..T...G.....C.....C...T.....
21. <i>Mandragora</i>	C.A.CG..T...G.....C...T.....
22. <i>Hyoscyamus</i>	AAA.CG..T...G.....C.....C...T.....
23. <i>Lycium</i>	GAA.CG..T...G.....C.....C...T.....
24. <i>Arabidopsis</i>	AAA.CG..T...G.....C.....C...T.....
25. <i>Sinapis</i>	AAA.CG..T...G.....-...C...T.....
26. <i>Lupinus</i>	CTA.AG..T...G.....C.....T.....
27. <i>Vicia</i>	AGA..G..T...G.....C.....T.....
28. <i>Vigna</i>	AAA.CG..T...G.....C.....T.....
29. <i>Cucumis</i>	CA..CG..T...G.....C.....C...T.....
30. <i>Populus</i>	TAA.CG..T...G.....C.....C...T.....

110.

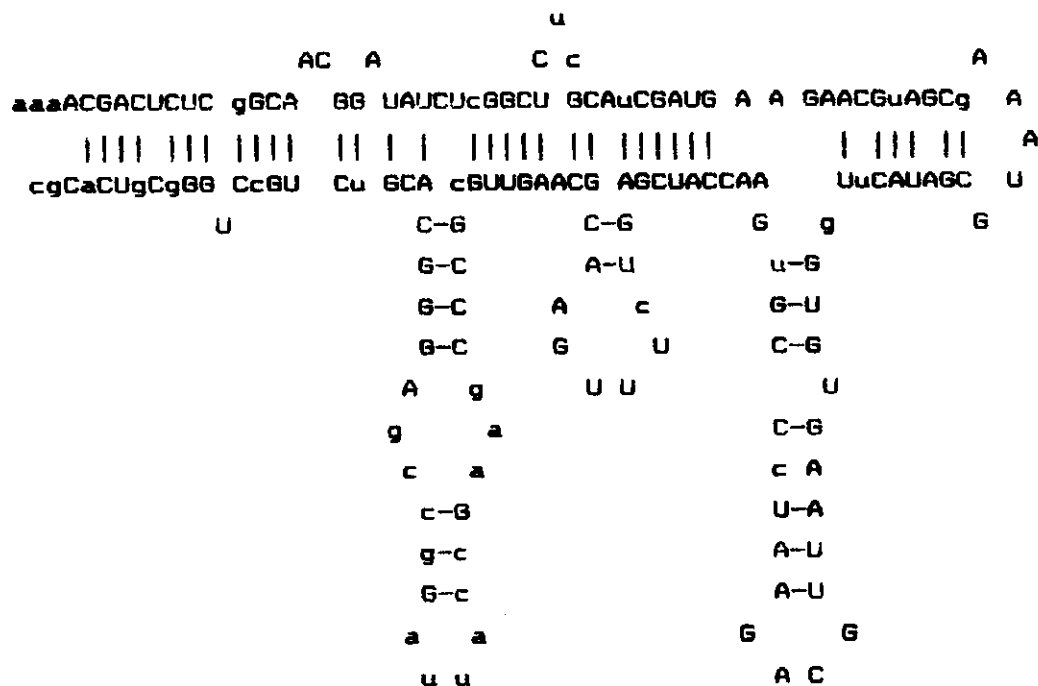
1. CAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCGCG-AATCATCGAGTCTTTGAA
 2.
 3. T.....T.....C..T.....
 4. T.....T.....C..T.....T.....
 5. T.....C.G.....C..T..C.....
 6. T.....C.G.....C.....C.....
 7. T.....C.G.....C.....C.....
 8. T.....C.G.....C.....C.....
 9. T.....C.G.....C.....C.....
 10. T.....C.G.....C.....C.....
 11. T.....C.G.....C.....C.....
 12. T.....C.G.....C.....C.....
 13. T.....G.....C.....C.....
 14. T.....C.G.....C.....C.....
 15. T...A.....T.G.....C..T..C.....T.....
 16. T...A.....T.G.....C..T..C.....T.....
 17. T...A.....T.G.....C..T..C.....T.....
 18. T.....T.G.....C..T..C.....
 19. T.....T.G.....C..T..C.....
 20. T.....T.G.....C..T..C.....
 21. T.....T.G.....C..T..C.....
 22. T.....T.G.....C..T..C.....
 23. TT.....T.G.....A...C..T.A..C.....A.....
 24. T.....T.G.....C..T..C.....
 25. T.....T.G.....A..G..C..T..C.....
 26. T.....T.G.....C..T..C.....
 27. T.....T.G.....C..T..C.....
 28. T.....T.G.....C..T..C.....
 29. T.....T.G.....G..C.....C.C.....
 30. T.....T.G.....C..T..C.....

165.

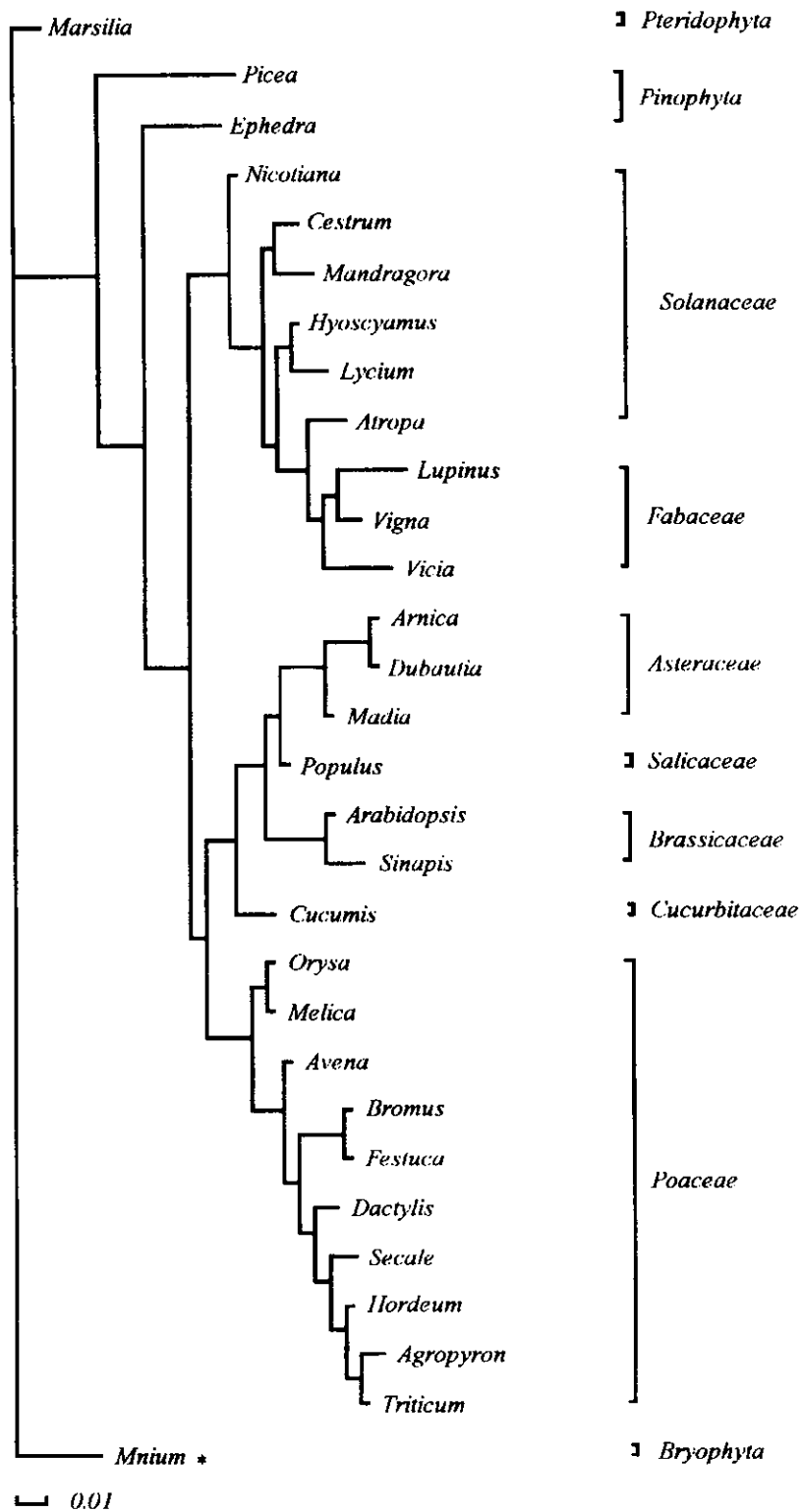
1. CGCAAGTTGCGCCCGAGGC---TCGTCCGAGGGCATTTCGGTTAGAGCGTCACC-
 2.-.....CG..T.CCT.....CA..
 3.-.....A..C...CG..A.....CG..T.CCT.G.....G.AA
 4.T...-...AGAAGGCC.T.GT.....CG..T..CT.G.....G.AT

11.CAC.T.G.....CGC.T.CCT.G.....GC
12.CAC...G.....CGC.T.CCT.G.....GC
13.CAC...G.....CGC.T.CCT.G.....GC
14.CAC...G.....CGC.T.CCT.G.....GC
15.T..A..CTTCT.GTT.....CG..T.CCT.G.....GC
16.A..CTTCT.GTTA.....CG..T.CCT.G.....TGC
17.A..CTTCT.G.T.....CG..T.CCT.G.....GC
18.A..CAC.A.G.T.....CG..T.CCT.G.....AC
19.A..CAC.A.G.....CG..T.CCT.G.....GC
20.A..CTT.A.G.....CG..T.CCT.G.....T
21.A..CAT.A.G.TA.A.....CG..T.CCT.G.....GC
22.A..CAT.A.G.....CG..T.CCT.G.....GC
23.T..CAT.A.G.....CG..T.CCT.G.....GC
24.C.A..CTTCT.G.....CG..T.CCT.G.T....AA
25.C.A..CTTCT.G.....CG..T.CCT.G.T....AA
26.A..CAT.A.G.....CGC.T.CCT.G.T..TG.AC
27.T..CAT.A.G.....CG..T.AAT.G.T....AT
28.A.A..CAT.A.G.-.....CGC.T.CCT.G.T....AC
29.BA..CTTCT.G.....CG..T.CCT.G.....GC
30.CTCCT.GT.....CG..T.CCT.G.T....GC

Мал. 1. Вирівняні нуклеотидні послідовності 5.8S рДНК 30 видів рослин



Мал. 2. Вторинна структура 5.8S рДНК *Nyoscyatus albus* згідно моделі Назара [цит по 16]. Малими літерами позначено потенційно філогенетично інформативні позиції



Мал. 3. Безкореневе дерево, збудоване за методом Neighbor-Joining. Зірочкою позначено вид-поляризатор

Процес вирівнювання послідовностей 5.8S рДНК вимагав 165 нуклеотидних позицій, причому 61 з них (40 %) виявилася варіабельною, тобто містила хоча б одну зміну в будь-якій вертикальній позиції нуклеотидів. З-поміж них 37 (22,4 %) нуклеотидних позицій були потенційно філогенетично інформативними, тобто такими, в яких спостерігалася однакова заміна чи втрата нуклеотиду одночасно в двох різних видів [11]. Звернувши увагу на їх локалізацію (мал. 2), неважко помітити, що переважаюча кількість потенційно філогенетично інформативних позицій тягнє до трьох дискретних ділянок молекули: її початку та кінця (позиції 1—3 та 156—164) і області «ГС-багатої» шпильки (позиції 124—138). На долю цих ділянок припадає 21 потенційно філогенетично інформативна позиція, що становить 56,8 % від загального їх числа.

Найпримітивнішою рослиною серед досліджених був листяний мох *Mnium rugicum*, саме його 5.8S рДНК і була використана як поляризатор (outgroup), тобто «сучасний предок» [30]. В топології отриманого дерева (мал. 3) можна виділити декілька чітко окреслених груп. Немає ніякого сумніву в розташуванні базових видів, що формують основу дерева. Це — листяний мох, папороть та два голонасінних види — ефедра та смерека. Квіткові рослини в свою чергу формують єдиний кластер, підтримуючи гіпотезу щодо їх монофілетичного походження [4]. Кластер покритонасінних поділяється на три гілки. Першу з них складають зближені між собою представники родин *Solanaceae* і *Fabaceae*. Решту покритонасінних віднесено до двох груп, одна з яких формується представниками виключно однодольних, а інша — видами родин *Cucurbitaceae*, *Salicaceae* і *Brassicaceae* та найбільш еволюційно просунутими видами родини *Asteraceae*. Види *Oryza sativa* і *Melica imperfecta* виявилися дуже близькими, разом з ними був згрупований і *Avena longiglumis*. З іншого боку, види *Triticum aestivum* і *Secale cereale* були ближчими до *Hordeum*, ніж до *Avena*, на це вказувалося і раніше [31]. Окрім того, справджується поділ представників підродини *Pooidae* на дві супертриби: *Pooidae* (триби *Poeae*, *Avenae*, *Melicae*) і *Triticodae* (триби *Bromae*, *Triticae*) [32] за єдиним виятком (*Bromus tectorum*).

Звичайно, реконструйовані в представленій роботі філогенетичні зв'язки не є єдиноможливими. Генетичного тексту однієї молекули часто буває недостатньо для реконструкції взаємозв'язків між родами [15]. Проте як вибір макромолекули [5], так і присутність в ній ділянок з різною швидкістю фіксації змін [16, 18] дають можливість окреслити

основні родинні зв'язки серед рослин у порівнянні з сучасними палео- та неботанічними висновками.

С. И. Комарницкий

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 5.8S ядерной рибосомной ДНК 30 видов растений

Резюме

Осуществлен сравнительный анализ первичной структуры 5.8S рДНК 30 видов растений, в том числе мха, папоротника, двух голосеменных и 26 покрытосеменных видов. 56,8 % потенциально филогенетически информативных позиций локализованы в трех дискретных участках молекулы. На основе этих данных очерчены основные родственные связи у растений.

S. I. Komarnitsky

Comparative analysis of nucleotide sequences of 5.8S nuclear ribosomal DNA of 30 plant species

Summary

The comparison of 5.8S rDNA primary structure of 30 plant species, in particular a moss, a fern, two gymnosperms and 26 angiosperms has been carried out. 56.8 % of potentially phylogenetically informative positions were located in three discrete parts of molecule. The unrooted phylogenetic tree was built based on these data.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Doyle J. A., Donoghue M. J. The importance of fossils in elucidating seed plant phylogeny and macroevolution // *Rev. Palynol.*—1987.—50.—P. 63—95.
2. Красилов В. А. Возникновение и ранние этапы эволюции цветочных растений.—М.: Наука, 1989.—127 с.
3. Мейен С. В. Основы палеоботаники.—М.: Недра, 1987.—403 с.
4. Takhtajan A. L. Flowering plants: origin and dispersal.—Washington D. C.: Smithsonian Inst., 1969.—320 p.
5. Archie J. W. Phylogenies of plant families: a demonstration of phylogenetic randomness in DNA sequence data derived from proteins // *Evolution.*—1989.—43.—P. 1796—1800.
6. Антонов А. С., Троицкий А. В. Результаты изучения эволюции рРНК растений заставляют усомниться в универсальности гипотезы «молекулярных часов» // *Журн. эволюцион. биохимии и физиологии.*—1986.—22, № 4.—P. 343—349.
7. Martin P. G., Boulter D., Penny D. Angiosperm phylogeny studied using sequences of five macromolecules // *Taxon.*—1985.—34.—P. 393—400.
8. Hsiao C., Chatterton N. J., Asay K. H., Jensen K. B. Phylogenetic relationships of 10 grass species — an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in Monocots // *Genome.*—1994.—37.—P. 112—120.
9. Hsiao C., Chatterton N. J., Asay K. H., Jensen K. B. Molecular phylogeny of the *Pooidae* (*Poaceae*) based on nuclear rDNA (ITS) sequences // *Theor. and Appl. Genet.*—1995.—90.—P. 389—398.
10. Hsiao C., Chatterton N. J., Jensen K. B. Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, *Triticeae* (*Poaceae*), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences // *Genome.*—1995.—38.—P. 211—223.

11. Baldwin B. G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the *Compositae* // *Mol. Phyl. Evol.*—1992.—1, N 1.—P. 3—16.
12. Suh Y., Thien L. B., Raeve H. E., Zimmer E. A. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in *Winteraceae* // *Amer. J. Bot.*—1993.—80.—P. 1042—1055.
13. Wojciechowski M. F., Sanderson M. J., Baldwin B. G., Donoghue M. J. Monophyly of aneuploid astragalus (*Fabaceae*): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences // *Ibid.*—1993.—80.—P. 711—722.
14. Sun Y., Skinner D. Z., Liang G. H., Hulbert S. H. Phylogenetic analysis of *Sorgum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA // *Theor. and Appl. Genet.*—1994.—89.—P. 26—32.
15. Troitsky A. V., Melekhovets Y. F., Rachimova G. M. et al. Angiosperm origin and early stages of seed plant evolution deduced from rRNA sequence comparisons // *J. Mol. Evol.*—1991.—32.—P. 253—261.
16. Мелеховец Ю. Ф., Троицкий А. В. Сравнительный анализ первичной и вторичной структур 5.8S рРНК высших растений // Докл. АН БССР.—1990.—34, № 4.—С. 372.
17. Erdmann V. A., Wolters J. Collection of published 5S, 5.8S and 4.5S ribosomal RNA sequences // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14S.—P. r1—r15.
18. D'Ovidio R. Nucleotide sequence of a 5.8S rDNA gene and of the internal transcribed spacers from *Populus deltoides* // *Plant. Mol. Biol.*—1992.—19, N 6.—P. 1069—1072.
19. Kavanagh T. A., Timmis J. N. Structure of the melon rDNA and nucleotide sequence of 17-25S spacer region // *Theor. and Appl. Genet.*—1988.—76.—P. 673—680.
20. Чемерис А. В., Вахитов В. А. Первичная структура гена 5.8S рРНК и внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК у диглоидной пшеницы *Triticum urartu* Thum. ex Gandil // Молекуляр. биология.—1989.—23, № 1.—С. 320—326.
21. Venkateswarlu K., Nazar R. A conserved core structure in the 18-25S rRNA intergenic region from tobacco, *Nicotiana rustica* // *Plant. Mol. Biol.*—1991.—17.—P. 189—194.
22. Schiebel K., Hemleben V. Nucleotide sequence of the 18-25S spacer region from rDNA of mung-bean // *Nucl. Acids Res.*—1989.—17.—P. 2852.
23. Takaiwa F., Oono K., Sugiura M. Nucleotide sequence of the 17-25S spacer region from rice rDNA // *Plant. Mol. Biol.*—1985.—4.—P. 355—364.
24. Комарницький С., Комарницький І., Кокс А., Пароконний А. Варіабельність 5.8S рДНК у деяких видів родини *Solanaceae* // Цитологія і генетика.—1997.—31, № 5.
25. Troitsky A. V., Bobrova V. K., Melekhovets Y. F., Valiejo-Roman K. M. The nucleotide sequence of 5.8S rRNA from the moss *Mnium rugicum* Laur // *Nucl. Acids Res.*—1989.—17.—P. 459.
26. Unfried I., Gruendler P. Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and of the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana* // *Ibid.*—1990.—18, N 13.—P. 4011.
27. Rathgeber J., Capesius I. Nucleotide sequence of the 18-25S spacer region from mustard rDNA // *Ibid.*—1989.—17.—P. 75—22.
28. Higgins D. G., Bleasby A. J., Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment // *CABIOS*—1992.—8.—P. 189—191.
29. Felsenstein J. PHYLIP — Phylogeny Inference Package. Version 3.5.—1992.
30. Рахімова Г. М., Троицкий А. В., Кликунова И. Н., Антонов А. С. Филогенетический анализ частичных нуклеотидных последовательностей 18S рРНК 14 видов растений // Молекуляр. биология.—1989.—23, № 3.—С. 830—842.
31. Enomoto S. I., Ogihara Y., Tsunevaki K. Studies of the origin of crop species by restriction endonuclease analysis of organellar DNA. I. Phylogenetic relationships among ten cereals revealed by the restriction fragment patterns of cp DNA // *Jap. J. Genet.*—1985.—60.—P. 411—424.
32. Macfarlane T. D. *Poaceae* subfamily *Pooideae* // *Grass systematics and evolution.*—Washington D. C.: Smithsonian Inst., 1987.—P. 265—276.

УДК 577.113:633.71

Надійшла до редакції 12. 11. 96