

Ампліфікація випадково поліморфної ДНК американських тютюнів підроду *Petunioides*

С. І. Комарницький, І. К. Комарницький

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

У роботі використано ампліфікацію випадково поліморфної ДНК для вивчення родинних зв'язків серед американських видів роду *Nicotiana*. Отримані результати свідчать про те, що аналіз такого роду дає вірогідний матеріал і є придатним для вивчення філогенетичних відносин у роді. Необхідно зауважити, що встановлення родинних зв'язків кожного виду окремо вимагатиме залучення даних інших молекулярно-біологічних методів аналізу, перш ніж походження того чи іншого виду може бути постульованим.

Вступ. Швидкий розвиток технологій з вивчення структури ДНК створив численні методи для використання генетичних маркерів з метою характеристики природних популяцій та дослідження еволюційних зв'язків між ними. Класичне маркування полягає в поєднанні рестриктивного аналізу з наступним електрофоретичним розмежуванням фрагментів. Ця процедура вимагає застосування Саузерн-гібридизації, а також значних коштів та часу [1, 2]. Більш сучасні методи генетичного маркування ДНК ґрунтуються на використанні продуктів полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Одним з таких методів є аналіз випадково ампліфікованої поліморфної ДНК — ВАПД (англійська абревіатура RAPD). Цей метод досить простий, вимагає малих кількостей ДНК і не потребує попереднього вивчення поліморфізму ДНК даного виду чи популяції для синтезу специфічних праймерів, оскільки ампліфікація проводиться з використанням одного довільного короткого праймера [3, 4].

Попередні дослідження показали ефективність застосування ВАПД у роді *Nicotiana* [5, 6]. Як відомо, близько 70 видів роду розподілені на три підроди (*Rustica*, *Tabacum* і *Petunioides*) [7]. Північна та Південна Америка є батьківщиною для 44 видів роду, тоді як решта поширена на австралійському і африканському континентах, окремих ост-

ровах Тихого океану. Даний метод використано для вивчення подібності між представниками окремих секцій роду. В першому випадку проаналізовано геноми дев'яти американських видів роду (підроди *Tabacum* і *Petunioides*) з метою підтвердження таксономічної позиції *N. sylvestris* [5]. В іншому дослідженні здійснено аналіз ВАПД австралійських видів роду *Nicotiana* (секція *Suaveolentes*), який виявив високий рівень поліморфізму в геномах [6]. Філогенетичне дерево родинних зв'язків серед видів секції, збудоване на основі цих даних, добре узгоджувалося з даними морфологічного і молекулярно-біологічного аналізів, проведених раніше [7, 8]. На відміну від вищезазначених видів, аналіз ВАПД не проводили для всіх видів підроду *Petunioides*, оскільки існують дані щодо родинних зв'язків у межах підроду *Petunioides* на основі первинної структури внутрішнього транскрибованого спейсера (ВТС) ядерної рибосомної ДНК [9]. Метою даної роботи було вивчення філогенетичних відносин між американськими видами підроду та їхнє порівняння з раніше опублікованими висновками молекулярної та класичної таксономії.

Матеріали і методи. Загальну ДНК виділяли з рослинного матеріалу (табл. 1), культивованого за стерильних умов, згідно з раніше описаною методикою [10]. ПЛР проводили на Gene ATAQ Controller ампліфікаторі фірми «Pharmacia-LKB» (Швеція) за такого температурного режиму: початковий цикл, 96 °С, 1 хв — 36 °С, 5 хв — 72 °С, 2 хв; наступні 40 циклів, 94 °С, 1 хв — 36 °С,

Таблиця 1
Американські види *Nicotiana* [7]

Підрід Секція	Вид	Кількість хромосом	
<i>Trigonophyllae</i>	<i>N. trigonophylla</i>	12	
	<i>Alatae</i>	<i>N. alata</i>	9
		<i>N. bonariensis</i>	9
	<i>N. forgetiana</i>	9	
	<i>N. langsdorffii</i>	9	
	<i>N. sanderiae</i>	9	
	<i>N. longiflora</i>	10	
	<i>N. plumbaginifolia</i>	10	
	<i>N. sylvestris</i>	12	
	<i>Noctiflorae</i>	<i>N. acaulis</i>	12
<i>N. petunioides</i>		12	
<i>Acuminatae</i>	<i>N. spegazzinii</i>	12	
	<i>N. acuminata</i>	12	
	<i>N. linearis</i>	12	
	<i>N. attenuata</i>	12	
	<i>N. corimbosa</i>	12	
	<i>N. miersii</i>	12	
<i>Repandae</i>	<i>N. pauciflora</i>	12	
	<i>N. nesophila</i>	24	
	<i>N. repanda</i>	24	
<i>Nudicaulea</i>	<i>N. stocktonii</i>	24	
	<i>N. nudicaulis</i>	24	
	<i>N. clevelandii</i>	24	

1 хв — 72 °С, 2 хв; заключний цикл, 94 °С, 1 хв — 36 °С, 1 хв — 72 °С, 10 хв. Реакційна суміш (20 мкл) містила 10 мМ трис-НСІ, рН 9,0 (при 25 °С), 50 мМ КСІ, 2 мМ MgCl₂, 0,1 %-й тритон X-100, 0,5 мкМ відповідний праймер, чотири дезокситрифосфати у концентрації 200 мкМ кожний, 40 нг ДНК і 0,5 одиниці Таq-полімерази («Promega», США). Після завершення реакції суміш швидко охолоджували і фракціонували в 3 %-й агарозі (1,5 % NA фірми «Pharmacia» і 1,5 % SepRate-SDF фірми «Amersham», Велика Британія), в однократному ТАЕ буфері. Використано чотири комерційні праймери ОРА-11, ОРА-13, ОРА-18 і ОРА-20 («Operon Technologies», США) (табл. 2). Кожну реакцію проводили щонайменше двічі. Розміри ампліфікованих фрагментів визначали, як описано раніше [11]. Драбинчастий молекулярний маркер (1 тис. п. н.) отриманий від фірми

Таблиця 2
Нуклеотидна послідовність праймерів

Праймер	Послідовність 5' ... 3'	Кількість ампліфікованих фрагментів	Розмір фрагментів, п. н.
ОРА-11	СААТСГСССГТ	47	320—1740
ОРА-13	СAGCACCCAC	56	260—1560
ОРА-18	AGGTGACCGT	58	270—2090
ОРА-20	GTTGCGATCC	50	230—2420

«Gibco» (США). Контрольні проби не містили ампліфікованих продуктів. Фрагменти, яких не було знайдено в усіх проаналізованих видах, вважалися поліморфними. Наявність та відсутність фрагмента позначалася символами 1 та 0 відповідно. Отриману матрицю поліморфних фрагментів проаналізовано методом максимальної економії (Dollo parsimony) за допомогою прикладного пакету філогенетичних програм PHYLIP, версія 3,5 [12].

Результати і обговорення. У попередньому дослідженні нами показано [6], що серед 20 проаналізованих праймерів (Operon Technologies, серія ОРА-01—20) лише чотири, а саме — ОРА-11, ОРА-13, ОРА-18, ОРА-20 показали 100 %-й рівень поліморфізму серед австралійських видів роду. Виходячи з такого результату, лише ці праймери були залучені до аналізу ВАПД серед американських видів *Nicotiana*. Профілі фрагментів, ампліфікованих з праймерами ОРА-13 та ОРА-18, наведено на рис. 1 та рис. 2 відповідно. У *N. petunioides* ампліфікується унікальний фрагмент ОРА-18 розміром 2090 п. н. (рис. 2, доріжка 2). Унікальні фрагменти виявлено також у *N. nudicaulis* (ОРА-18, 390 і 310 п. н., рис. 2, доріжка 3), *N. repanda* (ОРА-11, 1540 і 1500 п. н.), *N. acaulis* (ОРА-13, 270 п. н.), *N. clevelandii* (ОРА-13, 400 п. н.), *N. alata* (ОРА-20, 2060 п. н.). Назагал одержано 211 фрагментів розміром від 230 до 2420 п. н. (табл. 2). Записані у вигляді матриці фрагменти (1 — присутній, 0 — відсутній) проаналізовано методом максимальної економії для оцінювання рівня поліморфізму між американськими видами роду та для виявлення родинних зв'язків серед представників семи секцій підроду.

За умови, що *N. trigonophylla* використовується як поляризатор (один з найдавніших видів роду *Nicotiana* за Гудспідом [7]), отримано єдине філогенетичне дерево (рис. 3), яке, в свою чергу, добре узгоджується з раніше запропонованими філогенетичними схемами в підроді [7, 9]. Вид *N. re-*

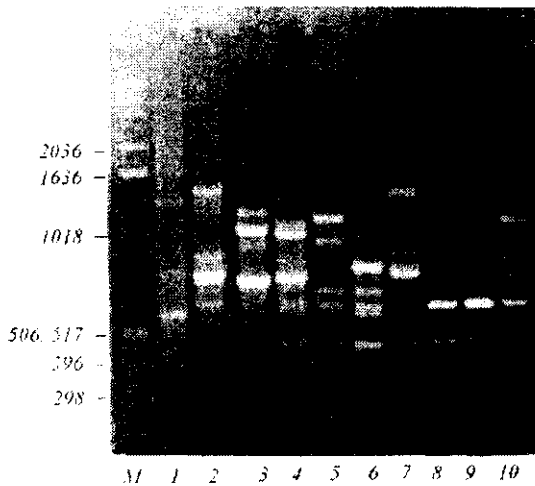


Рис. 1. Профіль ампліфікації випадково поліморфної ДНК, генерований праймером ОРА-13: М — маркер; 1 — *N. repanda*; 2 — *N. trigonophylla*; 3 — *N. longiflora*; 4 — *N. plumbaginifolia*; 5 — *N. bonariensis*; 6 — *N. langsdorffii*; 7 — *N. sylvestris*; 8 — *N. forgetiana*; 9 — *N. alata*; 10 — *N. sanderae*

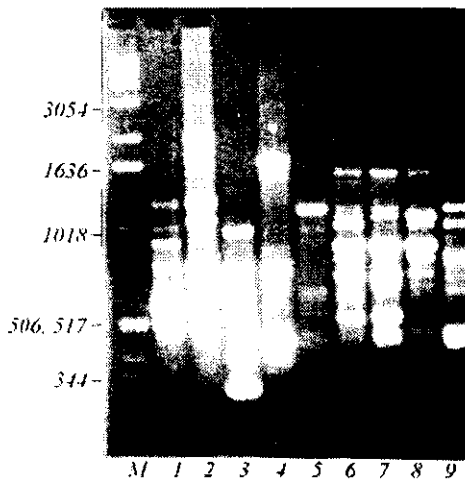


Рис. 2. Профіль ампліфікації випадково поліморфної ДНК, генерований праймером ОРА-18: М — маркер; 1 — *N. nesophila*; 2 — *N. petunioides*; 3 — *N. nudicaulis*; 4 — *N. linearis*; 5 — *N. corymbosa*; 6 — *N. acuminata*; 7 — *N. pauciflora*; 8 — *N. attenuata*; 9 — *N. miersii*

panda виявився найспорідненішим видом до *N. trigonophylla*. Виокремлення цього виду в монофілетичну гілку з-поміж двох інших видів секції *Repandae* (*N. stocktonii* і *N. nesophila*) підтримується тим фактом, що структурна організація

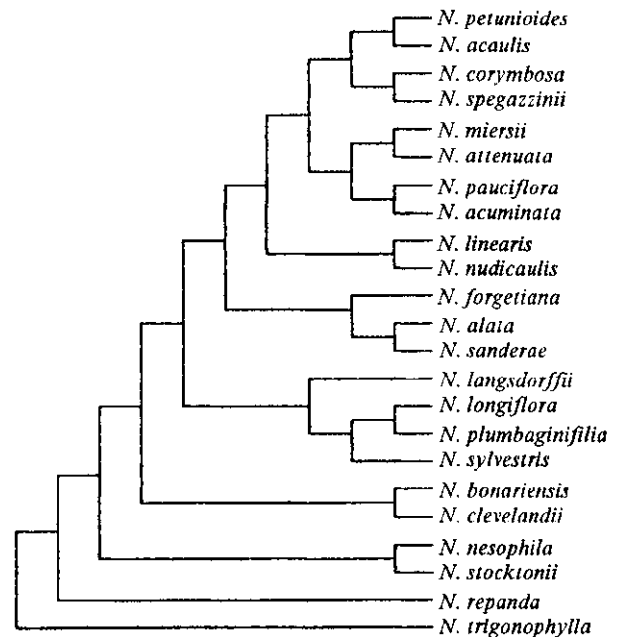


Рис. 3. Безкореневе дерево американських видів *Nicotiana*, реконструйоване методом максимальної економії

хлоропластної ДНК цього виду ближча до ДНК австралійських, але не американських видів ([12]: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Незважаючи на це, всі три види розташовані поряд в основі дерева. Три види секції *Alatae* — *N. alata*, *N. forgetiana* і *N. sanderae* віднесено до одного кластеру, що є одним з доказів арбітрарності проведеного аналізу *N. sanderae*, який є гібридом між двома вищеназваними видами [7].

По відношенню до цих видів решта видів секції *Alatae* розташована в сестринському кластері. Віднесення *N. clevelandii* до цього ж кластеру, очевидно, пояснюється тим, що попередники секції *Alatae* і *Acuminatae* брали участь у походженні цього виду. Незважаючи на це, *N. clevelandii* згрупована окремо від *N. longiflora* і *N. plumbaginifolia*, найімовірніших попередників цього виду [7]. Єдиний представник секції *Nudicaules* — *N. nudicaulis* знаходиться в одному кластері з видами секції *Acuminatae*. Це зумовлено тим, що *N. nudicaulis* походить від попередників видів цієї секції та секції *Trigonophyllae* [7]. Дані, отримані нами раніше на основі первинної структури ВТС рибосомної ДНК [9], дають дещо інший результат — *N. nudicaulis* ближче споріднений з видами секції *Repandae*. Це протиріччя легко усувається тим, що сучасні види

секції *Repandae* походять від спільного попередника з видами секції *Trigonophyllae* [7].

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що аналіз випадково ампліфікованої поліморфної ДНК серед 23 видів (7 секцій) підроду *Petunioides* дає вірогідний матеріал і є цілком придатним для вивчення філогенетичних відносин у роді. Потрібно зауважити, що встановлення родинних зв'язків кожного виду окремо потребуватиме залучення даних, отриманих за допомогою інших молекулярно-біологічних методів аналізу, перш ніж походження того чи іншого виду може бути точно встановленим.

S. I. Komarnytsky, I. K. Komarnytsky

Amplification of randomly polymorphic DNA of American tobaccos from *Petunioides* subgenus

Summary

Amplification of randomly polymorphic DNA is used to study the relations within the species of the genus *Nicotiana*. The results obtained confirmed this approach to be reliable and useful for phylogenetic analysis within the genus. The identification of relationships of every species requires an additional analysis of the data obtained by other molecular and biological assays to postulate its exact origin.

S. I. Komarnytsky, I. K. Komarnytsky

Амплифікація случайно поліморфної ДНК американських табаків подрода *Petunioides*

Резюме

В работе использована амплификация случайно полиморфной ДНК для изучения родственных связей среди американских видов рода *Nicotiana*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что такого рода анализ является достоверным и может быть использован для изучения филогении рода. Отмечено, что установление родственных связей каждого вида в отдельности нуждается в привлечении данных, полученных с помощью других молекулярно-биологических методов анализа, прежде чем происхождение того или иного вида будет постулировано.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Borisjuk N., Borisjuk L., Petjuch G., Hemleben V. Comparison of ribosomal RNA genes within *Solanum* and other *Solanaceae* // *Genome*.—1994.—37.—P. 271—280.
2. Комарницький І., Комарницький С. Поліморфізм довжин рестриктних фрагментів міжгенного спейсеру рибосомальної ДНК деяких видів тютюну // *Цитологія і генетика*.—1996.—30, № 1.—С. 65—71.
3. Tingey S. V., del Tufo J. P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers // *Plant Physiol*.—1993.—101.—P. 349—352.
4. Сиволан Ю. М., Солоденко А. Е., Бурлов В. В. RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника // *Генетика*.—1998.—34, № 2.—С. 266—271.
5. Yu Y.-L., Lin T.-Y. Construction of phylogenetic tree for *Nicotiana* species based on RAPD markers // *J. Plant Res*.—1997.—110.—P. 187—193.
6. Комарницький І. С., Комарницький І. К. Філогенетичне дерево австралійських видів роду *Nicotiana* на основі ампліфікації випадково поліморфної ДНК // *Биополимеры и клетка*.—2001.—17, № 4.—С. 278—282.
7. Goodspeed T. H. The genus *Nicotiana*.—Massachusetts: Waltham, 1954.—536 p.
8. Комарницький С. І. Спроба поєднати морфологічні ознаки та послідовності ядерної рибосомної ДНК (внутрішнього транскрибованого спейсера) у філогенетичних дослідженнях у роді *Nicotiana* // *Биополимеры и клетка*.—1999.—15, № 5.—С. 383—389.
9. Комарницький С. І., Комарницький І. К., Кокс А., Пароконний А. С. Еволюція послідовностей внутрішнього спейсера ядерної рибосомальної ДНК американських видів роду *Nicotiana* // *Цитологія і генетика*.—1998.—32, № 3.—С. 69—76.
10. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucl. Acids Res*.—1980.—8.—P. 4321—4325.
11. Комарницький І. К., Комарницький С. І. Поліморфізм довжин рестриктних фрагментів міжгенного спейсеру рибосомальної ДНК деяких видів тютюну // *Цитологія і генетика*.—1996.—30, № 1.—С. 65—71.
12. Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5.—1993.
13. Salts Y., Herrmann R. G., Peleg N., Lavi U., Frankel R., Beckmann J. S. Physical mapping of plastid DNA variation among eleven *Nicotiana* species // *Theor. and Appl. Genet*.—1984.—69, N 1.—P. 1—14.

УДК 577.113:633.71

Надійшла до редакції 18.12.2000