

Рестриктний поліморфізм ампліфікованих послідовностей хлоропластної ДНК роду *Nicotiana*

С. І. Комарницький, І. К. Комарницький

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

*Проведення полімеразно-ланцюгової реакції на невеликих ділянках хлоропластної ДНК з подальшим їхнім рестриктним гідролізом дозволяє спостерігати за рухом цитоплазми тютюнів у процесі формування їх як видів. Отримані результати свідчать про те, що цитоплазма культурного тютюну походить від попередників підроду *Rustica*. Два австралійських види *N. debneyi* і *N. fragrans* не мають нічого спільного з цитоплазмою решти видів секції *Suaveolentes*.*

Вступ. Незважаючи на те, що рід *Nicotiana* інтенсивно вивчався як класичними морфологами [1, 2], так і молекулярними біологами [3–6], на сьогоднішній день не з'ясоване походження цитоплазми багатьох природних диплоїдів і амфіплоїдів. Протягом останнього часу ампліфікація окремих ділянок хлоропластної ДНК (хлДНК) з наступним рестриктним аналізом виявилася високоефективною і більш інформативною, ніж рестриктний аналіз цілої молекули хлДНК [7–9]. У даному повідомленні на основі рестриктного аналізу ампліфікованих послідовностей хлДНК зроблено спробу обґрунтувати походження цитоплазми деяких видів роду *Nicotiana*.

Матеріали і методи. Насіння видів роду *Nicotiana* (таблиця) пророщували в чашках Петрі на фільтрувальному папері до появи двох сім'ядольних листків. Загальну ДНК виділяли з 50–100 мг проростків згідно з [10]. Полімеразно-ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили на Gene ATAQ Controller ампліфікаторі фірми «Pharmacia-LKB» (Швеція) в 30 мкл реакційної суміші (10 мМ трис-НСІ, рН 9,0, 50 мМ КСІ, 2 мМ MgCl₂, 0,1 % тритону X-100, відповідні праймери у концентрації 0,1 мкМ кожний, 200 мкМ кожний з чотирьох дезокситрифосфатів, 40 нг ДНК і 0,6 одиниці Taq-полімерази, температура 25 °С). Після завершення реакції 2 мкл ампліфікованого продукту гідролізували рестриктазами (*BinI*, *Clal*, *Ecl136*, *EcoRI*, *EcoRV*,

Eco47I, *DraI*, *HaeIII*, *HincII*, *HinfI*, *HindIII*, *HpaII*, *MvaI*, *NcoI*, *PvuI*, *PvuII*, *RsaI*, *SspI*, *StyI*, *TagI*, *XbaI*) в загальному об'ємі 20 мкл. Рестриктні фрагменти фракціонували в агарозному гелі в трис-ацетатній буферній системі.

Пару праймерів (5'-GAAGTAGTAGGATTGATTCTC-3' і 5'-TACAGTTGTCCATGTACCAG-3') [11] використали для ампліфікації спейсера між *atpB* (ген, що кодує бета субодиницю АТРази) і *rbcL* (кодує велику субодиницю рубіско). Ділянка, ампліфікована парою праймерів (5'-CATTACAAA-TGCGATGCTCT-3' і 5'-TCTACCGATTTCGCCA-TATC-3'), *trnT-trnL* [12], містить спейсер між геном *trnT* (кодує тРНК треоніну UGU) і 1-м екзоном *trnL* (кодує тРНК лейцину UAA). Ділянка, ампліфікована парою праймерів (5'-GTA-GACACG-CTGCTCTTAGG-3' і 5'-CGCCAGATG-TTCTATGGATAC-3'), *trnL-ndhD*, має 1536 п. н. у *N. tabacum* і містить практично весь ген *trnL* (кодує тРНК лейцину UAG), відкриту рамку зчитування 313 і частину 3'-кінця гена *ndhD*, який кодує субодиницю 4 НАД дегідрогенази. Послідовність останньої пари праймерів запропонував проф. Кун з Мюнхенського університету.

Результати і обговорення. Три ампліфіковані ділянки хлДНК тютюнів були ідентичними за розміром у всіх без винятку видів роду, в тому числі *Cestrum parqui* і *Petunia axillaris*. Ампліфіковану послідовність *atpB-rbcL* (1047 п. н.) гідролізували дев'ятьма рестриктазами (*Clal*, *EcoRI*, *DraI*, *NcoI*, *PvuI*, *RsaI*, *SspI*, *StyI*, *TagI*). Розмір гідролізованих

Види роду *Nicotiana*

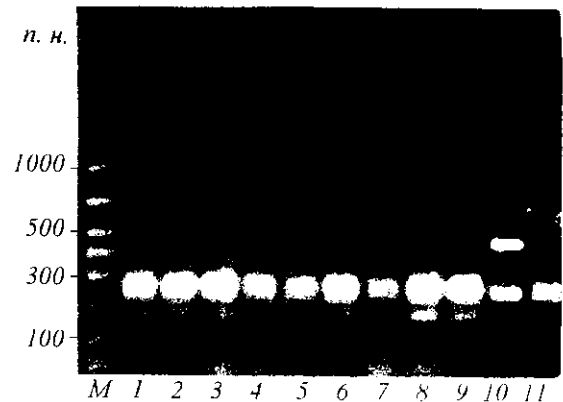
Підрід	Секція	Вид	Підрід	Секція	Вид		
<i>Rustica</i>	<i>Paniculatae</i>	<i>N. benavidesii</i>	<i>Petunioides</i>	<i>Bigelovianae</i>	<i>N. clevelandii</i>		
		<i>N. cordifolia</i>			<i>N. fragrans</i>		
		<i>N. raimondii</i>		<i>Suaveolentes</i>	<i>N. africana</i>		
		<i>N. knightiana</i>			<i>N. occidentalis</i>		
		<i>N. glauca</i>			<i>N. amplexicaulis</i>		
		<i>N. paniculata</i>			<i>N. debneyi</i>		
		<i>N. solanifolia</i>			<i>N. exigua</i>		
		<i>Rusticae</i>			<i>N. rustica</i>	<i>N. umbratica</i>	
					<i>Tabacum</i>	<i>Tomentosae</i>	<i>N. glutinosa</i>
		<i>N. kawakamii</i>					<i>N. benthamiana</i>
<i>N. otophora</i>	<i>N. cavicola</i>						
<i>N. tomentosa</i>	<i>N. excelsior</i>						
<i>N. tomentosiformis</i>	<i>N. hesperis</i>						
<i>N. setchellii</i>	<i>N. megalosiphon</i>						
<i>Genuinae</i>	<i>N. tabacum</i>	<i>N. rosulata</i>					
	<i>Petunioides</i>	<i>Undulatae</i>	<i>N. arentsii</i>	<i>N. simulans</i>			
<i>N. undulata</i>			<i>N. eastii</i>				
<i>N. wigandioides</i>			<i>N. goodspeedii</i>				
<i>Trigonophyllae</i>			<i>N. palmeri</i>	<i>N. gossei</i>			
			<i>N. trigonophylla</i>	<i>N. ingulba</i>			
<i>Alatae</i>			<i>N. alata</i>	<i>N. maritima</i>			
			<i>N. bonariensis</i>	<i>N. suaveolens</i>			
			<i>N. forgetiana</i>	<i>N. velutina</i>			
			<i>N. langsdorffii</i>				
			<i>N. sanderae</i>				
	<i>N. longiflora</i>						
		<i>N. plumbaginifolia</i>					
		<i>N. sylvestris</i>					
	<i>Noctiflorae</i>	<i>N. acaulis</i>					
		<i>N. noctiflora</i>					
<i>N. petunioides</i>							
<i>Acuminatae</i>	<i>N. spegazzinii</i>						
	<i>N. acuminata</i>						
	<i>N. linearis</i>						
	<i>N. attenuata</i>						
	<i>N. corymbosa</i>						
	<i>N. miersii</i>						
	<i>N. pauciflora</i>						
	<i>Repandae</i>	<i>N. nesophila</i>					
<i>N. repanda</i>							
<i>N. stocktonii</i>							
<i>Nudicaules</i>	<i>N. nudicaulis</i>						
	<i>Bigelovianae</i>	<i>N. bigelovii</i>					

фрагментів для шести рестриктаз (*DraI*, *RsaI*, *TagI*, *ClaI*, *NcoI* і *PvuI*) був однаковим у всіх видів. *StyI* гідролізує спейсер хлДНК *N. tabacum* між *atpB* і *rbcL* на три фрагменти 680, 252 і 115 п. н. [13]. Таку кількість фрагментів мають всі проаналізовані види за винятком *N. alata* і *N. langsdorffii*. У них є додатковий сайт у фрагменті 680. У *N. sanderae* (статевий гібрид між *N. forgetiana* і *N. alata*), який отримав Сандер на початку минулого століття [1], відсутній *StyI*-сайт у фрагменті 680, і тому цитоплазма *N. sanderae* може походити лише від *N. forgetiana*. Тоді як *N. alata* і *N. langsdorffii* близькі між собою види [1] і мають ідентичні *StyI*-фрагменти в цій ділянці хлДНК. Малоімовірно, що додатковий *StyI*-сайт у фрагменті 680 у них з'явився незалежно. Ймовірніше, що їхня цитоплазма походить від спільного попередника, який не міг походити від видів секції *Paniculatae* тому, що суцвіття і квіти диплоїду *N. langsdorffii* є

результатом комбінації секцій *Paniculatae* і *Alatae*. У *N. alata* така комбінація відсутня [1].

Рестриктаза *EcoRI* має п'ять сайтів у *atpB-rbcL* хлДНК *N. tabacum* (71 + 250 + 172 + 282 + 32 + 240) [13]. Усі види роду мають аналогічні фрагменти за винятком *N. suaveolens* (фрагменти менше 100 п. н. не враховували). У *N. suaveolens* в *atpB-rbcL* відсутній сайт між фрагментом 172 і 282 (рисунок, доріжка 10). Щоб виключити внутрішньовидовий поліморфізм цієї ділянки хлДНК, ми проаналізували окремі рослини *N. suaveolens*, насіння яких отримали з трьох незалежних колекцій: в Краснодарі (Росія), Нью-Джерсі (США) і К'ю (Англія), і не виявили різниці між ними. Згідно з [1], *N. suaveolens*, *N. debneyi* і *N. fragrans* є прямими нащадками попередників сучасних австралійських видів, які потрапили до Австралії з Південної Америки 60 млн років тому. Ці види вважаються базовими, в результаті гібридизацій і наступних інтрогресій між ними виникла решта австралійських тютюнів. З проведеного нами аналізу видно, що один з попередників *N. suaveolens* не є донором цитоплазми для австралійських видів. Подібний результат отримано нами раніше — мітохондріальні гени *N. suaveolens coxI* і *coxII* відрізняються від інших австралійських видів, у тому числі і *N. eastii* [14]. Останній вид, за твердженням [1], є автополіплоїд *N. suaveolens*, але отримані нами результати цього не підтверджують. Більшу рацію, на наш погляд, має Костов [2], вважаючи *N. eastii* ($n = 32$) природним гібридом між *N. maritima* ($n = 16$) і *N. velutina* ($n = 16$). Крім того, донорами цитоплазми по материнській лінії для австралійських видів також не могли бути попередники *N. debneyi* і *N. fragrans*, оскільки вони мають по одному *BinI*-сайту в ділянці *trnL-ndhD* (на відміну від решти видів Австралії) і через більшу подібність пласту *N. debneyi* до американських видів [15]. Результати здійсненого нами аналізу не узгоджуються з висновками [3] стосовно того, що *N. plumbaginifolia* — донор цитоплазми австралійських видів. Дійсно, *N. plumbaginifolia* причетна до походження *N. debneyi* і *N. suaveolens*, але винятково як донор частини ядерного геному. Друга частина ядерного геному *N. suaveolens* походить від одного з попередників *N. acaulis*, що належить до секції *Noctiflorae* [16], тому донора цитоплазми австралійських видів треба шукати там.

Серед 10 рестриктаз, які ми використали для гідролізу ділянки *trnL-ndhD*, лише *PvuI*-фрагменти були ідентичними у всіх видів. Наявність сайтів *Eco47I* і *HaeIII* відрізняє ампліфіковану ділянку видів секції *Acuminatae* від решти тютюнів. *Eco47I* має 4 сайти в *trnL-ndhD* на хлДНК *N. tabacum*



Електрофорез ампліфікованої послідовності *atpB-rbcL* після гідролізу *EcoRI*: M — маркер; 1 — *N. petunioides*; 2 — *N. ingulba*; 3 — *N. umbratica*; 4 — *N. excelsior*; 5 — *N. gossei*; 6 — *N. rotundifolia*; 7 — *N. fragrans*; 8 — *N. debneyi*; 9 — *N. eastii*; 10 — *N. suaveolens*; 11 — *N. occidentalis*

(773 + 130 + 264 + 305 + 64) [13], тоді як в усіх видів *Acuminatae* відсутній сайт між 305 і 64. Дана ділянка гідролізується *HaeIII* у тютюну на два фрагменти розміром 472 і 1064 п. н. [13]. Види секції *Acuminatae* мають додатковий сайт у фрагменті 1064 (100 + 964). Дві рестриктази *DraI* і *SspI* дають ідентичні фрагменти (699 + 837 і 540 + 649 + 347 відповідно) у всіх видів за таких винятків: перша гідролізує *trnL-ndhD* *N. otophora* на три фрагменти 200 + 499 + 837, тоді як друга поділяє *trnL-ndhD* *N. africana* на чотири фрагменти (540, 199, 450 і 347 п. н.).

Згідно з первинною структурою хлДНК тютюну (сорт Bright yellow 4), в *trnL-ndhD* ідентифіковано два сайти для *HpaII* (509 + 901 + 126) [13]. Грунтуючись на наших даних, аналогічну будову мають майже всі тютюни за винятком кількох видів. У *N. plumbaginifolia* і *N. repanda* відсутній сайт між 509 і 901. На відміну від них види секції *Acuminatae* мають іншу послідовність *HpaII*-фрагментів на даній ділянці хлДНК (510 + 776 + 250). Додатково у *N. pauciflora* відсутній сайт між 510 і 776, а у *N. corymbosa* — між 776 і 250.

За результатами гідролізу ділянки *trnT-trnL* (773 п. н.) рестриктазою *HinfI* (93 + 371 + 92 + 100 + 117), пластом роду можна поділити на дві великі групи. До першої належить *N. tabacum*, а також усі види секції *Paniculatae* (виняток становить *N. glauca*), *N. rustica*, види секції *Undulatae*, *N. sylvestris*. Хлоропласти останнього виду успадкував культурний тютюн по материнській лінії при

гібридизації *N. sylvestris* з *N. tomentosiformis* [17]. Таким чином, пластом *N. sylvestris*, який належить до секції *Alatae*, походить від попередників підроду *Rustica*. До другої групи належить решта видів роду і відрізняються вони від видів першої групи наявністю додаткового сайту у фрагменті розміром 371 п. н.

S. I. Komarnytskyu, I. K. Komarnytskyu

Restriction polymorphism of amplified fragments of the genus *Nicotiana* chloroplast DNA

Summary

Using the PCR amplification of short regions of the chloroplast DNA together with their subsequent restriction digestion, it is possible to follow the cytoplasm inheritance during the genus *Nicotiana* development. The data obtained confirmed the cultivated tobacco cytoplasm to originate from the *Rustica* subgenus ancestors. Two Australian species, *N. debneyi* and *N. fragrans*, have nothing in common with the cytoplasm of other species of *Suaveolentes* section of the genus.

С. И. Комарницкий, И. К. Комарницкий

Рестриктный полиморфизм амплифицированных последовательностей хлоропластной ДНК рода *Nicotiana*

Резюме

Проведение полимеразно-цепной реакции на небольших участках хлДНК с последующим их рестриктным гидролизом позволяет проследить за перемещением цитоплазмы табаков в процессе развития рода. Полученные результаты подтверждают тот факт, что цитоплазма культивируемого табака унаследована от предшественников подрода *Rustica*. Два австралийских вида *N. debneyi* и *N. fragrans* не имеют ничего общего с цитоплазмой остальных видов секции *Suaveolentes*.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Goodspeed T. H. The genus *Nicotiana*.—Massachusetts: Waltham, 1954.—536 p.
2. Kostoff D. Cytogenetics of the genus *Nicotiana*.—Sofia: State Printed House, 1941.—Vol. 43.—1071 p.
3. Kung S. D., Zhu Y. S., Shen G. F. *Nicotiana* chloroplast genome. III. Chloroplast DNA evolution // *Theor. and Appl. Genet.*—1982.—61.—P. 73—79.
4. Комарницкий С. І., Комарницкий І. К., Кокс А., Пароконний О. С. Еволюція послідовностей внутрішнього транскрибуемого спейсера ядерної рибосомальної ДНК американських видів роду *Nicotiana* // *Цитологія і генетика.*—1998.—32, № 3.—С. 69—76.
5. Комарницкий С. И., Комарницкий И. К., Кокс А., Пароконний А. С. Молекулярная филогения ядерных генов 5.8S

рибосомальной ДНК 37 видов рода *Nicotiana* // *Генетика.*—1998.—34, № 7.—С. 883—889.

6. Комарницкий С. І. Спроба поєднати морфологічні ознаки та послідовності ядерної рибосомної ДНК в філогенетичних дослідженнях в роді *Nicotiana* // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 5.—С. 383—389.
7. Parducci L., Szmidt A. E. PCR-RFLP analysis of cpDNA in the genus *Abies* // *Theor. and Appl. Genet.*—1999.—98.—P. 8020—8028.
8. Tsumura Y., Kawahara T., Wickneswari R., Yishimura K. Molecular phylogeny of *Dipterocarpaceae* in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes // *Theor. and Appl. Genet.*—1996.—93.—P. 22—29.
9. Parani M., Lakshmi M., Ziegenhagen B., Fladung M., Senthilkumar P., Parida A. Molecular phylogeny of mangroves VII. PCR-RFLP of *trnS-trnC* and *rbcL* gene region in 24 mangrove and mangrove-associate species // *Theor. and Appl. Genet.*—2000.—100.—P. 454—460.
10. Cheung W. Y., Hubert N., Landry B. S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // *PCR Meths. Applics.*—1993.—3.—P. 69—70.
11. Savolainen V., Corbar R., Moncousin C., Spichiger R., Manen J.-F. Chloroplast DNA variation and parentage analysis in 55 apples // *Theor. and Appl. Genet.*—1995.—90.—P. 1138—1141.
12. Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // *Plant Mol. Biol.*—1991.—17.—P. 1105—1109.
13. Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-Shinozaki K., Ohto C., Torazawa K., Meng B. Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kata A., Tohdoh N., Shimada H., Sugiura M. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome // *Plant Mol. Biol. Rep.*—1986.—4.—P. 111—147.
14. Комарницкий И. К., Череп Н. Н. Полиморфизм длины рестриктных фрагментов митохондриальной ДНК рода *Nicotiana* // *Цитология и генетика.*—1994.—28, № 4.—С. 47—59.
15. 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.—P. 1—14.
16. Комарницкий С. І. Субповтори міжгенного спейсера рибосомальної ДНК *Nicotiana* // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 2.—С. 108—114.
17. Gray J. G., 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.

УДК 577.113:633.71

Надійшла до редакції 19.03.01