ВІСНИК
УКРАЇНСЬКОГО ТОВАРИСТВА
ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ

УДК 577.113.5: 582.926.2

МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ 5S рДНК ДВОХ УКРАЇНСЬКИХ ПОПУЛЯЦІЙ ЯВОРА (*ACER PSEUDOPLATANUS)*

О. О. РУСАК, В. І. ПЕТРАЩУК, І. І. ПАНЧУК, Р. А. ВОЛКОВ

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012, Україна
E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Мета. *Генетична мінливість деревних порід все ще залишається мало дослідженою на молекулярному рівні. З огляду на порівняно низьку швидкість молекулярної еволюції у деревних багаторічних видів, для вивчення їх внутрішньовидового різноманіття слід обирати лише ті ділянки геному, які демонструють найвищу мінливість, напр., 5S рДНК. Відповідно, для оцінки потенціалу 5S рДНК в якості молекулярного маркера у деревних порід, було порівняно організацію цієї ділянки у представників двох географічно віддалених українських популяцій явора Acer pseudoplatanus.* ***Методи.*** *ПЛР-ампліфікація, клонування та розшифрування нуклеотидної послідовності МГС 5S рДНК A. pseudoplatanus.* ***Результати.*** *Встановлено, що у геномі A. pseudoplatanus присутній лише один клас повторів 5S рДНК довжиною 475 нп. Потенційні зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III, які локалізуються у МГС, відрізняються від описаних у літературі для представників інших родин покритонасінних рослин. Рівень внутрішньогеномної подібності повторів 5S рДНК перевищує 99 %, тоді як подібність МГС індивідуумів, які належать до різних популяцій явора становить лише 93,9–94,3 %.* ***Висновки.*** *Висока швидкість молекулярної еволюції МГС 5S рДНК дозволяє використовувати порівняння цієї ділянки для оцінки генетичного різноманіття у популяціях A. pseudoplatanus.*

Ключові слова*: 5S рДНК, молекулярна еволюція, внутрішньовидова мінливість, Acer.*

Вступ. Деревні породи привертають значну увагу дослідників, оскільки вони становлять основу лісових екосистем. Проте, внутрішньовидове різноманіття та генетична мінливість деревних порід все ще залишаються мало дослідженими на молекулярному рівні. Однією з причин, яка ускладнює молекулярно-генетичний аналіз багатолітніх деревних видів, є їх відносно низька (порівняно з трав'янистими однолітниками) швидкість молекулярної еволюції. Отже, для виявлення генетичної різниці між популяціями та окремими індивідуумами слід обирати лише ті ділянки геному, які демонструють найвищу еволюційну мінливість. До таких ділянок, зокрема, належить 5S рДНК [1, 2, 3].

Ділянки 5S рДНК відносять до класу тандемно організованих повторюваних послідовностей, що утворюють кластери та локалізовані на одній чи декількох хромосомах [4]. Кожна повторювана одиниця складається з еволюційно консервативної ділянки, яка кодує 5S рДНК та варіабельного міжгенного спейсера (МГС). МГС характеризується високим темпом еволюції, тому в цій ділянці можна виявити різницю навіть між близькоспорідненими видами, популяціями, а інколи — і між окремими особинами [1, 3].

На сьогодні молекулярна організація 5S рДНК у представників роду *Acer* (до якого належать більше ста деревних видів [5, 6]) та споріднених груп залишається невивченою. Відповідно, ми поставили перед собою задачу оцінити можливість використання 5S рДНК для диференціації популяцій широко розповсюдженого у лісах Європи виду — явора, *Acer pseudoplatanus.*

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були зразки *A. pseudoplatanus* з двох географічно віддалених регіонів України: зразок X87 було зібрано у Сторожинецькому районі Чернівецької області, а зразок Y67 — поблизу від м. Ялта, АР Крим.

© О. О. РУСАК, В. І. ПЕТРАЩУК, І. І. ПАНЧУК, Р. А. ВОЛКОВ, 2016

Загальну ДНК екстрагували з гербаризованого листя згідно стандартної методики виділення ДНК з цетавлоном [7].

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для цього використовували пару універсальних праймерів 5S-14a-Ph (5'-GCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3') і 5S-15-Not (5'-CATTGCGGCC-GCTTAACTTCGGAGTTCTGATGGGA-3'), які комплементарні до ділянки, що кодує 5S рРНК у дводольних рослин [1]. Використана пара праймерів дозволяє ампліфікувати майже повний повтор 5S рДНК: лише 9 нп у центральної частини кодуючої ділянки залишаються неампліфікованими. Праймер 5S-14a-Ph містив на 5'-кінці фосфатну групу, що дозволяє збільшити ефективність лігування при клонуванні ПЛР-продуктів за тупим кінцем, а праймер 5S-15-Not — додатковий сайт впізнавання рестриктази NotI, який було використано у подальшому клонуванні. Застосовані праймери забезпечують ампліфікацію повного МГС та фланкуючих ділянок кодуючої послідовності. Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила такі компоненти: 10–30 нг ДНК, 1,0 од. акт ДНК-полімерази (Phusion DNA polymerase, Thermoscientific), 0,1 мМ суміші дезоксирибонуклеотидфосфатів, 1^x буфер для ПЛР та 0,5 мкМ кожного з двох праймерів. ПЛР проводилася з використанням ампліфікатора MiniCycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази — 95 °С, 2 хв; (2) денатурація ДНК — 95 °С, 45 с; (3) гібридизація праймерів — 58 °С, 40 с; (4) синтез ДНК — 72 °С, 1 хв; (5) закінчення ампліфікації — 72 °С, 8 хв; припинення реакції — 4 °С; загальна кількість циклів ампліфікації — 35. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофоретичного аналізу у 1,5 % агарозному гелі.

Для клонування ПЛР-продукти обробляли рестриктазою NotI. Після цього отримані фрагменти ДНК лігували з використанням Т4 ДНК-лігази (Thermoscientific) по фосфорильованому тупому кінцю та утвореному липкому кінцю у плазмідний вектор Litmus 38, попередньо розщеплений рестриктазами EcoRV і Bsp120I. Трансформацію продуктів лігування у компетентні клітини лінії *Escherichia coli* XL-blue проводили методом електропорації з використанням приладу E. coli Pulsher (BioRad, США). Колонії, що містили рекомбінанті плазміди, виявляли методом blue-white colony selection. Плазміди виділяли методом лужного лізису [8]. Ферментативні реакції проводили згідно з рекомендаціями фірми-постачальника.

Наявність вставки у плазмідах перевіряли, застосовуючи ПЛР з праймерами M13/pUC forward (For) та reverse (Rev), сайти гібридизації яких знаходяться в плазмідній ДНК з двох боків від полілінкера. Рекомбінантні плазміди, що містили інсерти 5S рДНК сиквенували на фірмі GATC (Німеччина). Первинну обробку отриманої нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR [9]. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Clustal V [10].

Результати та обговорення

Електрофоретичний аналіз ампліфікатів повторюваної ділянки 5S рДНК показав, що для обох використаних зразків ДНК утворюється лише один ПЛР-продукт довжиною близько 350 нп. Це вказує, що у геномі *A. pseudoplatanus* присутній лише один варіант повтору 5S рДНК.

У проведених нами експериментах по клонуванню було відібрано по 20 колоній трансформантів для кожної з двох досліджених популяцій. Наявність вставки у плазмідах перевіряли методом ПЛР з парою праймерів For та Rev. За результатами електрофоретичного розділення отриманих ПЛР-продуктів було встановлено, що всі вони мають однакову довжину. По два клони для кожної популяції було сиквеновано.

Комп'ютерний аналіз отриманих послідовностей показав, що всі чотири просиквеновані клони містять у складі вставки МГС 5S рДНК, фланкований з обох сторін фрагментами кодуючої послідовності. Довжина ділянки МГС становить 244 нп (табл. 1). Враховуючи, що довжина кодуючої ділянки 5S рДНК у еукаріот становить 120 нп [1, 4, 11], можна підрахувати, що повна довжина повтору 5S рДНК у *A. pseudoplatanus* становить 475 нп.

Таблиця 1. Характеристика сиквенованих повторюваних ділянок 5S рДНК *Acer pseudoplatanus*

Назва клону	Довжина інсерту, нп	Довжина МГС, нп	Характеристика МГС	Вміст GC-пар, %	
				Кодуюча ділянка	МГС
Aps-X87-1	355	244	Повнорозмірний	56,76	43,44
Aps-X87-2	355	244	Повнорозмірний	56,76	43,44
Aps-Y67-1	355	244	Повнорозмірний	56,76	43,03
Aps-Y67-2	355	244	Повнорозмірний	56,76	43,03

Вирівнювання отриманих нуклеотидних послідовностей показало, що два клони 5S рДНК зразка X87 ідентичні між собою, тоді як між двома клонами для зразка Y67 виявлено різницю в одну трансверсію A→T у МГС. Водночас рівень подібності між клонованими ділянками 5S рДНК двох популяцій виявився нижчим і становив 95,5–95,8 %. Ця різниця пов'язана в першу чергу із мутаціями в МГС, в межах якого (у порівнянні з консенсусною послідовністю) було виявлено 1 транзицію та 8 трансверсій для зразка X87 і 1 транзицію та 4 трансверсії для зразка Y67 (рис. 1). На загал рівень подібності МГС для двох досліджених зразків ДНК становить 93,9–94,3 % (табл. 2). У кодуючій ділянці клони Y67-1 та –2 відрізняються лише однією трансверсією C→G.

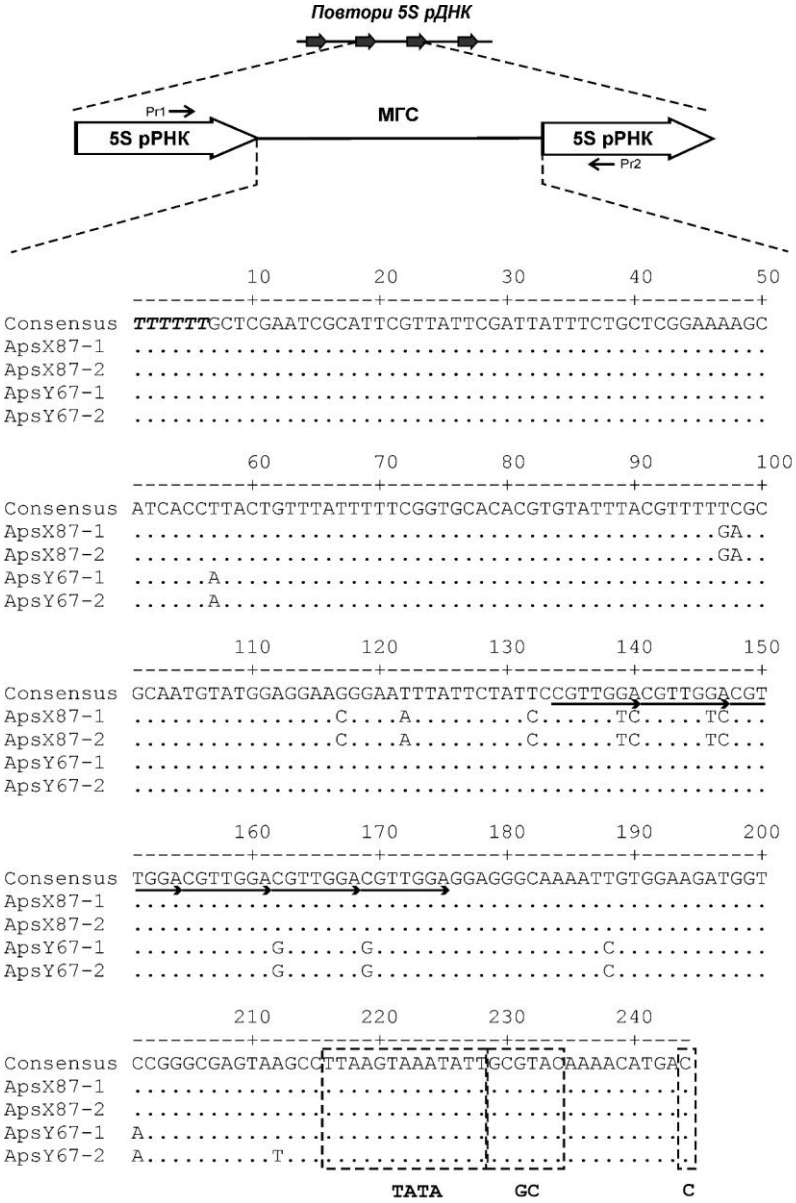

Рисунок 1. Структурна організація МГС 5S рДНК *Acer pseudoplatanus*. Pr1 та Pr2 — праймери 5S-14a-Ph та 5S-15, відповідно. Жирним курсивом виділено оліго-Т послідовність термінатора та потенційні елементи зовнішнього промотора. Стрілками позначено розташування повторюваних мотивів у МГС.

Таблиця 2. Рівень подібності (%) МГС 5S рДНК *Acer pseudoplatanus*

1	**2**	**3**	**4**	
100	100	94,3	93,9	**1**
	100	94,3	93,9	**2**
		100	99,6	**3**
			100	**4**

Примітка: 1 — клон Aps-X87-1; 2 — Aps-X87-2; 3 — Aps-Y67-1; 4 — Aps-Y67-2.

Аналіз отриманих послідовностей показав, що в МГС клонів *A. pseudoplatanus* присутні мотиви, необхідні для роботи РНК-полімерази III, яка забезпечує транскрипцію 5S рДНК. До таких мотивів, зокрема, належить оліго-Т послідовність, яка локалізована безпосередньо після 3'-кінця кодуючої ділянки і виконує функцію термінатора транскрипції [11].

Відомо, що крім зони термінації, у МГС мають бути присутні інші ділянки, необхідні для транскрипції, а саме — зовнішні елементи промотора 5S рДНК, які беруть участь в ініціації транскрипції. Це питання було найбільш докладно досліджено для *Arabidopsis thaliana* (родина Brassicaceae), для якого встановлено, що до елементів промотора 5S рДНК належать мотиви TATATA, GC та C, які знаходяться у МГС, відповідно, у позиціях -28, -13 та -1 від 5'-кінця кодуючої ділянки [11]. За нашими попередніми даними, гомологічні мотиви присутні також у 5S рДНК видів, які належать до таксономічно віддалених порядків дводольних (Solanales [1, 12], Rosales [13], Fabales [14]) і навіть однодольних рослин (Poales [15]). Відповідно, можна було очікувати, що подібні мотиви будуть присутні і у МГС *A. pseudoplatanus*, який є більш спорідненим з *Arabidopsis thaliana*, оскільки порядки Brassicales та Sapindales належать до одної клади Malvids (Eurosids II) [16].

Аналіз послідовності МГС *A. pseudoplatanus* показав, що у позиції -1, як і у інших видів рослин, дійсно присутній нуклеотид C. Проте, динуклеотид GC відсутній у позиції -13, а знаходиться у позиції -16. Крім того, у позиціях -14 та -12 присутні мотиви GT та AC, які відрізняються від GC на одну транзицію (рис. 1). Можна припустити, що один з цих трьох мотивів може слугувати елементом промотора 5S рДНК *A. pseudoplatanus.*

Також виявилось, що у МГС *A. pseudoplatanus* в позиції -28 шестинуклеотидний мотив TATATA відсутній. Натомість в позиції -29 від 5'-кінця кодуючої ділянки розташовується AT-багатий мотив TTTAAGTAAATATT, що ймовірно функціонально замінює шестинуклеотидний TATATA мотив, який було знайдено у інших рослин. Отже, на загал можна стверджувати, що 5S рДНК *A. pseudoplatanus* демонструє ряд специфічних структурних рис, які досі не зустрічались у інших покритонасінних рослин.

Проведений нами аналіз також встановив, що у МГС присутні шість прямих субповторів CGTTGGA (рис. 1), які, імовірно, виникли як результат тандемних дуплікацій. У клонів, отриманих для зразка X87 перший і другий субповтори містять на 3' кінці дві трансверсії, які імовірно є результатом двонуклеотидної інверсії (GA→TC). Для зразка Y67 у п'ятого та шостого субповторів виявлено трансверсію C→G першого нуклеотиду. У наших попередніх дослідженнях короткі субповтори в центральній частині МГС було виявлено для 5S рДНК *Solanum* [12] та *Rosa* [13]. Отже, можна припустити, що у рослин різних таксономічних груп наявна тенденція незалежного виникнення субповторів у центральній частині МГС, можливим механізмом чого може бути «прослизування» нитки ДНК під час реплікації (slippage of replication).

Висновки

1. У геномі явора *A. pseudoplatanus* присутній лише один клас повторів 5S рДНК довжиною 475 нп. Потенційні зовнішні елементи промотора РНК-

полімерази III, які локалізуються у МГС, відрізняються від описаних у літературі для представників інших родин покритонасінних рослин.

2. У МГС 5S рДНК індивідуумів, які належать до різних популяцій явора, виявлено ряд мутацій, що вказує на можливість використовувати порівняння цієї ділянки для оцінки внутрішньовидового генетичного різноманіття *A. pseudoplatanus.*

Перелік літератури

1. *Volkov R. A., Zanke C., Panchuk I. I., Hemleben V.* Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding // Theor. Appl. Genet. — 2001. — Vol. 103. — P. 1273–1282.
2. *Denk T.* The oaks of western Eurasia. Traditional classifications and evidence from two nuclear markers // Taxon. — 2010. — Vol. 59. — P. 351–366.
3. *Saini A., Jawali N.* Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications // Plant Syst. Evol. — 2009. — Vol. 280. — P. 187–206.
4. *Cloix C., Tutois S.* Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms // Genom Res. — 2000. — Vol. 10. — P. 679–690.
5. *Кохно Н. А.* Клены Украины. — К. : Наук. думка, 1982 — 184 с.
6. *de Jong P. C., Gelderen D. M., Oterdoom H. J.* Taxonomy and reproductive biology of maples // In: van Gelderen D. M., de Jong P. C., Oterdoom H. J. (eds). Maples of the world. — Timber Press, Portland, 1994. — P. 69–104.
7. *Rogers S. O., Bendich A. J.* Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. — 1985. — Vol. 5. — P. 69–76.
8. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* Molecular cloning // New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. — 1626 p.
9. *DNASTAR*, 1998. MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
10. *Higgins D. G., Bleasby A. J., Fuchs R.* CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment // Bioinformatics. — 1992. — Vol. 8. — P. 189–191.
11. *Douet J., Tourmente S.* Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis* // Heredity. — 2007. — Vol. 99. — P. 5–13.
12. *Давидюк Ю. М., Молода О. О., Волков Р. А.* Молекулярна організація 5S рДНК *Solanum betaceum* Cav. // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2013. — Т. 11, № 1. — С. 14.
13. *Tynkevich Y, Volkov R.* Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. — Cytol. Genet. — 2014. — Vol. 48, № 1. — P. 1–6.
14. *Тинкевич Ю. О., Невельська А. О., Чорней І. І., Волков Р. А.* Організація міжгенного спейсера 5S рДНК *Lathyrus venetus* // Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2015. — Т. 13, № 1. — С. 81–87.
15. *Volkov A. R., Panchuk I. I.* 5S rDNA of *Dactylus glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2014. — Т. 12, № 1. — С. 3–11.
16. *Angiosperm Phylogeny Group.* An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III // Bot. J. Lin. Soc. — 2009. — Vol. 161. — P. 105–121.

Представлена Кунахом В. А.
Надійшла 24.10.2016

MOLECULAR ORGANIZATION OF 5S rDNA IN TWO UKRAINIAN POPULATIONS OF SYCAMORE *(ACER PSEUDOPLATANUS)*

O. O. Rusak, V. I. Petrashchuk,
I. I. Panchuk, R. A. Volkov

Dept. of Molecular Genetics and Biotechnology
Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi
Kotsiubynski str., 2, 58012, Chernivtsi, Ukraine
E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Aim. The genetic variability of tree species has still not been studied enough at the molecular level. Considering the relatively low rate of molecular evolution in perennial tree species, it is necessary to use only those regions of genome, which demonstrate a high level of variability, such as 5S rDNA. Accordingly, to estimate the potential of 5S rDNA as a molecular marker for tree species, the organization of this genomic region was compared between samples from two geographically remote Ukrainian populations of sycamore, *Acer pseudoplatanus*. **Methods**. PCR amplification, cloning and sequencing of the 5S rDNA IGS of *A. pseudoplatanus*. **Results**. It was shown that only one variant of 5S rDNA repeat with a length of 475 bp is present in the genome of *A. pseudoplatanus*. Also, it was found that the elements typical for the angiosperm RNA polymerase III promoter, which are localized in IGS, appear to be different from those previously described for species of other families. The level of IGS sequence similarity within the populations exceeds 99 %, while the level of IGS sequence similarity between various populations is only 93,3–94,3 %. **Conclusions**. High rate of molecular evolution of the 5S rDNA IGS makes them a convenient molecular marker for evaluation of intraspecific variation in populations of *A. pseudoplatanus.*

Keywords: 5S rDNA, molecular markers, intraspecific variability, *Acer.*