

УДК 577.113.5:582.926.2

**МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ 5S рДНК
SOLANUM BETACEUM CAV.**

Ю.М. ДАВИДЮК, О.О. МОЛОДА, Р.А. ВОЛКОВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

Україна, 58012, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2

e-mail: ra.volkov@gmail.com

Мета. 5S рДНК належить до класу тандемно організованих помірно повторюваних послідовностей і використовується як зручний інструмент для досліджень молекулярних змін протягом еволюції геномів еукаріот. Зокрема, швидко еволюціонуючий міжгенний спейсер (МГС) може значно відрізнятися навіть у близькоспоріднених видів. Проте досі залишається нез'ясованим, чи може змінюватися характер еволюції МГС під час видоутворення у межах однієї таксономічної групи. Для з'ясування цього питання ми здійснили клонування та сиквенування МГС 5S рДНК *Solanum betaceum* (підрид *Bassovia*) і порівняли його молекулярну організацію з такою в інших видів *Solanum*. **Методи.** Повторювані одиниці 5S рДНК було ампліфіковано методом ПЛР, клоновано у бактеріальний вектор та сиквенувано. **Результати.** Встановлено, що МГС 5S рДНК *S. betaceum* має довжину 187 пн і містить субповтори кількох типів, знайдених у раніше досліджених видів *Solanum*. Протягом еволюції МГС *S. betaceum* відбулися делеції кількох коротких фрагментів, тоді як головним напрямком молекулярної еволюції у підродах *Solanum* і *Leptostemonum* була ампліфікація субповторів.

Ключові слова: *Solanum*, 5S рДНК, молекулярна еволюція.

Вступ. Під *Solanum L.*, один з найбільших у родині *Solanaceae* і взагалі у покритонасінних рослин, включає більш як 1500 видів, розповсюджених переважно у Центральній і Південній Америці [1–3]. Частина із них використовуються як важливі сільськогосподарські культури або слугують сировиною для отримання фармацевтичних препаратів [4], що зумовлює необхідність всебічного вивчення цього роду. Проте робота із створення єдиної систематики роду *Solanum* досі не завершена, що пов'язано, зокрема, з багаточисельністю видів, різноманітністю їхніх морфологічних ознак, високим рівнем модифікаційної мінливості та існуванням природних гібридів між окремими видами [2, 3, 5].

Для вирішення спірних питань систематики та таксономії роду в останні десятиліття все ширше використовуються молекулярно-генетичні маркери [6, 7], зокрема ділянки ядерної та хлоропластної ДНК [8–13]. До таких маркерів належать і гени, що кодують 5S рибосомальну РНК, які прийнято позначати як 5S рДНК. У геномі еукаріот 5S рДНК належить до фракції помірно повторюваних послідовностей і нараховує кілька сотень або тисяч повторюваних одиниць, розташованих на одній або кількох хромосомах у вигляді тандемно організованих кластерів [14, 15]. До складу повторюваної одиниці 5S рДНК входять висококонсервативна кодуюча ділянка та варіабельний міжгенний спейсер (МГС). Порівняння послідовностей кодуючої ділянки дозволяє визначати філогенетичні зв'язки на рівні таксонів вищого рангу, натомість послідовності МГС зручні

© Ю.М. ДАВИДЮК, О.О. МОЛОДА, Р.А. ВОЛКОВ, 2013

для проведення порівняльного аналізу на рівні родів і видів [16, 17]. Раніше нами показано можливість використання послідовностей МГС 5S рДНК для визначення шляхів молекулярної еволюції та з'ясування філогенетичних зв'язків у видів секції *Petota* Dumort підроду *Solanum* L. [18] та у *S. melongena* L. (підрид *Leptostemonum* (Dunal) Bitter, секція *Melongena* (Mill.) Dunal) [19]. Метою нашої роботи було встановлення первинної нуклеотидної послідовності та визначення особливостей структурної організації МГС 5S рДНК виду *Solanum betaceum* Cav., який належить до підроду *Bassovia*, секція *Pachyphylla*.

Матеріали і методи

Сумарну ДНК виділяли із гербарних зразків *S. betaceum* за методикою з використанням лізуючого буфера з цетавлоном [20]. Для ампліфікації повторюваної одиниці 5S рДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) було використано пару праймерів 5S-14a-Not (5'-CAATGCG GCCGCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTG AC-3') і 5S-15 – Not (5'-CATTGCGGCCGCT TAACTTCGGAGTTCTGATGGGA-3') виробництва «MWG Oligo Synthese», Німеччина, послідовності яких розраховувалися виходячи з наявної інформації про послідовності кодуючої ділянки гена 5S рДНК різних видів дводольних рослин [14, 18]. З метою подальшого лігування в сайт впізнавання ендонуклеази *Eco52* I на 5'-кінці праймерів було додано послідовність, що відповідає сайту впізнавання ендонуклеази *Not* I (GCGGCCGC). Для ПЛР-ампліфікації використовували ДНК-полімеразу *DreamTaq* («Fermentas», Литва). Кількість ДНК для ампліфікації складала 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1× буфер для ПЛР (PCR-buffer, «Fermentas»), суміш dNTP – 0,2 мМ кожного, праймери – 1 мМ кожного, ДНК-полімераза – 1–2 од. активності на реакцію. Загальний об'єм реакційної суміші

складав 25 мкл. ПЛР проводилася з використанням приладу *MiniCycler* («MJ Research Inc», США) за такою програмою: 1) початкова активація ДНК-полімерази – 95 °С, 3 хв.; 2) денатурація ДНК – 94 °С, 30 с; 3) посадка праймерів – 57 °С, 30 с.; 4) синтез ДНК – 72 °С, 1 хв.; 5) закінчення ампліфікації – 72 °С, 8 хв.; 6) припинення реакції – 4 °С. Загальна кількість циклів ампліфікації – 40. Продукти ПЛР розділяли методом електрофорезу в 1% агарозному гелі.

Отримані ПЛР-продукти розщеплювали ендонуклеазою рестрикції *Not* I («Fermentas») і лігували по липких кінцях у сайт *Eco52* I плазміді *pLitmus 38* з використанням Т4 ДНК-лігази («Fermentas»). Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL-blue рекомбінантними плазмідами проводили методом електропорації, використовуючи прилад *E. coli Pulser* («BioRad», США). Скринінг колоній здійснювали методом *blue-white colony selection*. Рекомбінантні плазміді з відібраних колоній виділяли методом лужного лізису [21]. Ідентифікацію рекомбінантних плазмід здійснювали шляхом розщеплення ендонуклеазою рестрикції *Eco52* I («Fermentas»). Всі ферментативні реакції проводили відповідно до рекомендацій виробника.

З ідентифікованих клонів, що містили вставки 5S рДНК, два було сиквененовано з використанням *Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit* на сиквенаторі *ABI Prism 310* («PE Applied Biosystems», США). Первинну обробку та аналіз отриманої первинної нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми *Chromas* та пакета програм комп'ютерної обробки даних *DNASTAR* [22]. Для порівняльного аналізу використовувалися послідовності 5S рДНК декількох видів підроду *Solanum* (секції *Petota* та *Dulcamara* (Moench) Dumort) і виду *S. melongena*.

Результати та обговорення

У відібраних рекомбінантних клонах ідентифіковано вставки завдовжки приблизно 300 пн. Проведене сиквенування вставок у двох клонах дозволило встановити, що довжина сиквенованої ділянки складає 299 пн. За результатами порівняльного аналізу послідовності даної ділянки *S. betaceum* з раніше сиквенованими послідовностями повторюваної одиниці 5S рДНК інших видів *Solanum* виявлено, що вона складається з фрагментів кодуючих ділянок гена 5S рРНК і міжгенного спейсера між ними завдовжки 187 пн (рисунок). Це значення близьке до довжини МГС досліджених видів *Solanum*, яка перебуває у межах від 165 до 229 пн [18, 19]. Вміст GC-пар у МГС *S. betaceum* дорівнює 52,9%, що незначно перевищує такий у видів *Solanum* секції *Petota* (45,6–52,3%) і *S. melongena* (49%) та менший, ніж у *S. dulcamara* (57,7%).

Еволюційно консервативні послідовності кодуючої ділянки 5S рДНК *S. betaceum* виявили високий рівень подібності з гомологічними ділянками інших видів *Solanum* – 95–100%. Натомість рівень подібності послідовності МГС значно нижчий: від 71,4% при порівнянні з *S. melongena* до 81,0% порівняно з *S. laxissimum* (секція *Petota*).

У результаті порівняльного аналізу встановлено, що структурно МГС *S. betaceum* організований аналогічно до МГС інших видів *Solanum*. Так, у ньому знайдено 3'- і 5'-фланкуючі ділянки (ФД), що межують з кодуючими ділянками, і центральну варіабельну ділянку (ВД). 3'- і 5'-ФД МГС *S. betaceum* завдовжки 16 і 53 пн, відповідно, демонструють рівень подібності, близький до такого при порівнянні кодуючих ділянок: у 3'-ФД він складає від 81,2% (*S. brevidens*) до 93,8% (10 видів *Solanum*, секція *Petota*), а у 5'-ФД – від 88,2% (*S. lycopersicum*) до 94,1% (7 видів

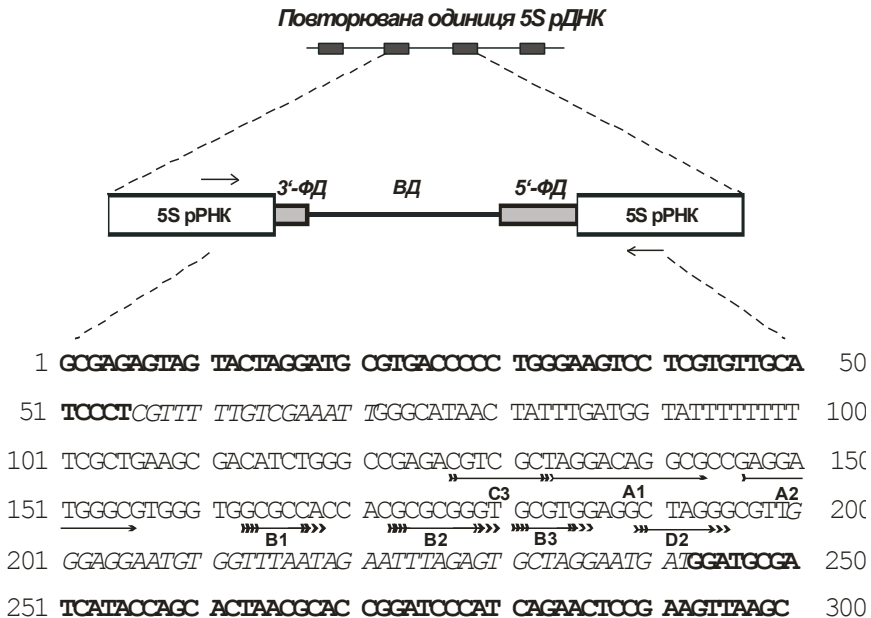


Рисунок. Структурна організація повторюваної одиниці 5S рДНК *S. betaceum*. Жирним шрифтом виділено кодуючі ділянки. Курсивом виділено 3'- і 5'-фланкуючі ділянки (ФД). Стрілками позначені повторювані мотиви, гомологічні субповторам раніше досліджених видів *Solanum*

Solanum, секція *Petota*). Високий рівень подібності засвідчує імовірне важливе значення фланкуючих ділянок у ініціації та термінації транскрипції гена 5S рРНК. Відмінності 3'- і 5'-ФД *S. betaceum* за довжиною від порівнюваних видів *Solanum* зумовлені делецією одного нуклеотида у 3'-ФД та одно- і двонуклеотидною делецією у 5'-ФД. У межах 5'-ФД МГС *S. betaceum* у положенні від –28 до –24 знайдено мотив ТААТА, а у положенні від –12 до –11 – динуклеотид GC, необхідні, як вважається, для ініціації транскрипції [23].

Рівень подібності послідовності ВД варіює від 61,2% (*S. melongena*) до 77,4% (*S. spegazzinii*), тобто суттєво нижчий порівняно з ФД, що свідчить про вищу швидкість накопичення еволюційних змін. Відмінності у послідовності ВД зумовлені насамперед наявністю трьох делецій – 20, 9 і 7 нуклеотидів – та точковими замінами. У межах ВД в МГС *S. betaceum* знайдено повторювані мотиви, що відповідають: 1) субповторам А1, А2, С3 та D2, виявленим раніше у МГС *S. melongena* [19]; 2) субповторам В1, В2 та В3, характерним для видів секції *Petota* [18] і відсутнім у МГС *S. melongena* (рисунок). Видається імовірним, що субповтори типу В виникли у видів *Solanum* Нового Світу після дивергенції від спільного з *S. melongena* предка. Подальша незалежна еволюція призвела до втрати видами секції *Petota* ділянок, що відповідають субповторам типів С і D, накопичення точкових замін у предковому субповторі типу А та до його подальшої ампліфікації. Натомість для молекулярної еволюції МГС *S. betaceum* більше характерні делеції послідовностей з кількох нуклеотидів, а не ампліфікація окремих мотивів, як у інших досліджених видів *Solanum*.

Висновки

Отримані результати дозволяють припустити, що на відміну від більшості досліджених видів *Solanum*, що належать до

підродів *Solanum* і *Leptostemonum*, молекулярна еволюція 5S рДНК яких проходить переважно шляхом дуплікації окремих мотивів і супроводжується зростанням довжини МГС, у *S. betaceum* (підрід *Bassovia*) вона характеризується переважанням делецій коротких фрагментів та загальним зменшенням довжини МГС.

Перелік літератури

1. *Frodin D.G.* History and concepts of big plant genera // *Taxon*. – 2004. – Vol. 53. – P. 753–776.
2. *D'Arcy W.G.* The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography // *Solanaceae III*. – London, 1991. – P. 75–113.
3. *Nee M.* Synopsis of *Solanum* in the New World. In: *Nee M., Symon D.E., Lester R.N., Jessop J.P.* (eds) *Solanaceae IV. Advances in biology and utilization*. – Kew: Royal Botanic Gardens, 1999. – P. 285–334.
4. *Hawkes J. G.* The economic importance of the family *Solanaceae*/ In: *M. Nee, D.E. Symon, R.N. Lester, J.P. Jessop* (eds). *Solanaceae IV. Advances in biology and utilization*. – Kew: Royal Botanic Gardens, 1999. – P. 1–8.
5. *Knapp S.* A revision of the *Solanum havanense* species group and new taxonomic additions to the Geminata clade (*Solanum*, *Solanaceae*) // *Ann. Missouri Bot. Gard.* – 2008. – Vol. 95, № 3. – P. 405–458.
6. *Manoko M.L.K., van den Berg R.G., Feron R.M.C., van der Weerden G. M., Mariani C.* AFLP markers support separation of *Solanum nodiflorum* from *Solanum americanum* sensu stricto (*Solanaceae*) // *Plant Syst. Evol.* – 2007. – Vol. 267. – P. 1–11.
7. *Barchi L., Lanteri S., Portis E., Asquadro A., Valè G., Toppino L., Rotino G.L.* Identification of SNP and SSR markers in eggplant using RAD tag sequencing // *BMC Genomics*. – 2011. – Vol. 12. – P. 304–312.
8. *Bohs L.* Phylogeny of the *Cyphomandra* clade of the genus *Solanum* (*Solanaceae*) based on ITS sequence data // *Taxon*. – 2007. – Vol. 56, № 4. – P. 1012–1026.
9. *Weese T.L., Bohs L.* A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (*Solanaceae*) // *Syst. Bot.* – 2007. – Vol. 32, № 2. – P. 445–463.
10. *Stern S., Bohs L.* An explosive innovation: phylogenetic relationships of *Solanum* section *Gonatotrimum* (*Solanaceae*) // *PhytoKeys*. – 2012. – Vol. 8. – P. 83–98.
11. *Tepe E.J., Bohs L.* A molecular phylogeny of *Solanum* sect. *Pterioidea* (*Solanaceae*) and the utility of COSII markers in resolving relationships

- among closely related species // *Taxon*. – 2010. – Vol. 59, № 3. – P. 733–743.
12. *Tepe E.J., Farruggia F.T., Bohs L.* A 10–gene phylogeny of *Solanum* section *Herpystichum* (Solanaceae) and a comparison of phylogenetic methods // *Am. J. Bot.* – 2011. – Vol. 98, № 8. – P. 1356–1365.
 13. *Poczai P., Hyvonen J., Symon D.E.* Phylogeny of kangaroo apples (*Solanum* subg. *Archaeosolanum*, Solanaceae) // *Mol. Biol. Rep.* – 2011. – Vol. 38. – P. 5243–5259.
 14. *Cloix C., Tutois S., Mathieu O., Cuvillier C., Espagnol M.C., Picard G., Tourmente S.* Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms // *Genome Res.* – 2000. – Vol. 10. – P. 679–690.
 15. *Fregonezi J.N., Fernandes T., Torezan J.M.D., Vieira A.O.S., Vanzela A.L.L.* Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA // *Genet. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 29, № 1. – P. 97–104.
 16. *Negi M.S., Rajagopal J., Chauhan N., Lakshmikumaran M.* Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides* // *Genome*. – 2002. – Vol. 45, № 6. – P. 1181–1188.
 17. *Steenkamp E.T., van der Nest M.A., Wingfield M.J., Wingfield B.D.* Detection of hybrids in commercially propagated *Eucalyptus* using 5S rDNA sequence // *Forest Genet.* – 2003. – Vol. 10, № 3. – P. 195–205.
 18. *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.
 19. *Davidjuk Y.M., Hemleben V., Volkov R.A.* Structural organization of 5S rDNA of eggplant, *Solanum melongena* L. // *Біол. сист.* – 2010. – Т. 2, № 1. – С. 1–7.
 20. *Rogers S.O., Bendich A.J.* Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi // In: *Plant Mol. Biol. Manual*. – Belgium, 1994. – P. 1–8.
 21. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
 22. *DNASTAR.*, 1998. MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
 23. *Douert 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.

Представлено І.О. Андреевим
Надійшла 18.04.2013

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ 5S рДНК *SOLANUM BETACEUM* CAV.

Ю.Н. Давидюк, О.А. Молода, Р.А. Волков

Черновицкий национальный университет
имени Юрия Федьковича
Украина, 58012, Черновцы, ул. Коцюбинского, 2
e-mail: ra.volkov@gmail.com

Цель. 5S рДНК относится к классу тандемно организованных умеренно повторяющихся последовательностей и используется как удобный инструмент для исследований молекулярных изменений в ходе эволюции геномов эукариот. В частности, быстро эволюционирующий межгенный спейсер (МГС) может значительно отличаться даже у близкородственных видов. Однако до сих пор остаётся невыясненным, может ли изменяться характер эволюции МГС при видообразовании в пределах одной таксономической группы. Для ответа на этот вопрос мы осуществили клонирование и сиквенирование МГС 5S рДНК *Solanum betaceum* (подрод *Bassovia*) и сравнили его молекулярную организацию с таковой у других видов *Solanum*. **Методы.** Повторяющиеся единицы 5S рДНК были амплифицированы методом ПЦР, клонированы в бактериальный вектор и сиквенированы. **Результаты.** Установлено, что МГС 5S рДНК *S. betaceum* имеет длину 187 пн и содержит субповторы нескольких типов, обнаруженных у ранее исследованных видов *Solanum*. В ходе эволюции МГС *S. betaceum* произошли делеции нескольких коротких фрагментов, тогда как главным направлением молекулярной эволюции в под родах *Solanum* и *Leptostemonum* была амплификация субповторов.

Ключевые слова: *Solanum*, 5S рДНК, молекулярная эволюция.

MOLECULAR ORGANIZATION OF 5S rDNA OF *SOLANUM BETACEUM* CAV.

Y.M. Davidjuk, O.O. Moloda, R.A. Volkov

Yurii Fedkovych University of Chernivtsi
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynski str., 2
e-mail: ra.volkov@gmail.com

Aim. 5S rDNA belongs to the class of tandemly arranged moderately repeated sequences and

represents a useful tool for investigation of molecular alterations in eukaryotic genomes during the evolution. Especially, rapidly evolving intergenic spacer (IGS) can differ significantly even in closely related species. However, it remains still unclear if the mode of IGS evolution may change during speciation within the same taxonomic group. In order to clarify this question we have cloned and sequenced the 5S IGS of *Solanum betaceum* (subgenus *Bassovia*) and compared their molecular organization with that one of other *Solanum* species. **Methods.**

The 5S rDNA repeated units were amplified by PCR, cloned in bacterial vector and sequenced.

Results. It was shown that the IGS of 5S rDNA of *S. betaceum* has the length of 187 bp and contains subrepeats of several types found early in other *Solanum* species. Several short deletions occurred during the evolution of *S. betaceum* IGS, whereas amplification of subrepeats was the main mode of molecular evolution in subgenera *Solanum* and *Leptostemonum*.

Key words: *Solanum*, 5S rDNA, molecular evolution.