

Субповтори міжгенного спейсера рибосомної ДНК *Nicotiana*

С. І. Комарницький

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 48, Київ, 03143, Україна

*Рестриктивний аналіз ядерної ДНК у сукупності з блот-гібридизацією був використаний для вивчення поширення субповторів з центральної частини міжгенного спейсера рДНК *Nicotiana tabacum* серед 68 видів роду *Nicotiana*. Показано, що *N. plumbaginifolia* чи *N. longiflora* була донором рДНК видів *N. clevelandii* (*Bigeloviana*), *N. debneyi* та *N. suaveolens* (*Suaveolentes*). Донором другої частини ядерного геному *N. debneyi* могли бути *N. corymbosa*, *N. miersii* чи *N. spagazzinii*, в той час як для *N. suaveolens* таким видом міг бути *N. acaulis*.*

Вступ. Рибосомні гени в геномі рослин повторені багаторазово і організовані в тандем. Кожна повторювана одиниця містить транскрибуючу послідовність для генів 18S, 5.8S і 26S рРНК та міжгенний спейсер (МГС) між генами 26S і 18S рРНК [1]. МГС вміщує різну кількість субповторів, які зумовлюють його гетерогенність за довжиною [2]. Послідовності, які регулюють транскрипцію генів рРНК, також знаходяться в цьому районі [3]. Поряд з цим було показано, що послідовності, які входять до МГС, можуть також знаходитися і за межами генів рибосомної РНК. Блот-гібридизація субповтору 325 п. н. з МГС рДНК рису показала, що ці послідовності розсіяні по геному [4]. У *Vigna radiata* послідовності, які не зв'язані з рДНК, знаходяться у сателітній ДНК і їх не знайдено в геномі *V. angularis* [5].

Nicotiana — один з родів родини пасльонових. Він пов'язаний родинними зв'язками з родами *Cestrum* і *Petunia*. Рід виник 60 мільйонів років тому в Південній Америці і поширився в Північну Америку та Австралію. Види, що належать до підроду *Rustica* і *Tabacum*, в основному, походять від природного комплексу, тоді як види підроду *Petunioides* — від петуніоїдного комплексу [6]. Переважна більшість сучасних видів роду виникла в результаті міжвидової гібридизації [6, 7]. Зокрема природний амфідиплоїд *N. tabacum* виник у

результаті міжвидової гібридизації між *N. sylvestris* і *N. tomentosiformis* [8], а *N. rustica* і *N. arentsii* — між *N. paniculata* і *N. undulata*, *N. wigandoides* і *N. undulata* відповідно [9]. Для з'ясування походження вищих рослин, крім аналізу хлоропластного [10, 11] і мітохондріального геномів [12] чи повторюваних послідовностей [13, 14], часто використовують ядерні гени рибосомної РНК [15—17]. Їхній аналіз у межах роду *Nicotiana* показав велику варіабельність МГС рДНК [18—20]. Тому метою даної роботи було дослідження видоспецифічності ділянки МГС *N. tabacum* до решти видів роду.

Матеріали і методи. Більшість рослинного матеріалу культивували в стерильних умовах [21]. Насіння 68 видів роду люб'язно передані нам А. П. Гребьонкіним (НПО «ТАБАК», Росія), Г. Геде (Інститут генетики рослин та дослідження культурних рослин, ФРН), В. Шулаєвим (університет Нью-Джерсі, США) (таблиця). Загальну ДНК виділяли з листків згідно з процедурою, описаною раніше [22]. Рестриктази *BamHI*, *XbaI*, *DraI*, *EcoRI*, *HindIII*, *EcoRV* були отримані з фірми «Ферментас» (Литва). ДНК у кількості 1 мкг гідролізували згідно з інструкцією фірми. Після гідролізу ДНК рестриктні фрагменти розділяли в 0,8 %-му агарозному гелі і переносили їх на нейлонові фільтри лужним способом [23]. Фільтри гібридували, як описано раніше [24]. Проби мітили, використовуючи метод розсіяної затравки [25]. У дослідженнях було використано вставку з проби *pNts-12* розміром біля 1 тис. п. н. з цен-

Характеристика видів роду *Nicotiana* та повторів ДНК

Секція Вид	Довжини класів рДНК, тис. п. н.	pNts-12 у межах МГС	pNts-12 поза межами МГС
<i>Paniculatae</i>			
<i>N. benavidesii</i>	11,5; 10,8	2/1	—
<i>N. cordifolia</i>	10,8	2	—
<i>N. glauca</i>	10,5	2	—
<i>N. knightiana</i>	10,9	2	—
<i>N. paniculata</i>	9,5	2	—
<i>N. raimondii</i>	10,8	2	—
<i>N. solanifolia</i>	10,5	2	—
<i>Rusticae</i>			
<i>N. rustica</i>	10,2; 9,9; 9,5	2/2/2	—
<i>Tomentosae</i>			
<i>N. glutinosa</i>	10,8	2	—
<i>N. kawakamii</i>	10,6	3	+
<i>N. otophora</i>	13,5	3	+
<i>N. setchellii</i>	12,4; 12,0	3/3	—
<i>N. tomentosa</i>	13,5	3	—
<i>N. tomentosiformis</i>	12,0	3	+
<i>Genuinae</i>			
<i>N. tabacum</i>	10,7; 9,6	2/2	+
<i>Undulatae</i>			
<i>N. arentsii</i>	9,9; 9,8	3/3	—
<i>N. undulata</i>	10,3; 10,0	3/3	—
<i>N. wigandioides</i>	10,7	2	—
<i>Repandae</i>			
<i>N. nesophila</i>	9,4; 9,2	1/2	—
<i>N. repanda</i>	9,4; 9,2	2/1	—
<i>N. stocktonii</i>	9,4; 9,2	1/2	—
<i>Trigonophyllae</i>			
<i>N. palmeri</i>	9,9	3	—
<i>N. trigonophylla</i>	9,9	3	—
<i>Alatae</i>			
<i>N. alata</i>	10,8	2	—
<i>N. bonariensis</i>	10,6	2	—
<i>N. forgetiana</i>	10,7	2	—
<i>N. langsdorffii</i>	9,8	2	+
<i>N. longiflora</i>	10,0; 9,9	0	—
<i>N. plumbaginifolia</i>	10,0	0	—
<i>N. sanderae</i>	10,8	2	—
<i>N. sylvestris</i>	9,6; 9,5	2/2	—
<i>Noctiflorae</i>			
<i>N. acaulis</i>	9,1	2	+
<i>N. noctiflora</i>	19,0	1	—
<i>N. petunioides</i>	19,0	1	—

Закінчення таблиці

Секція Вид	Довжини класів рДНК, тис. п. н.	<i>pNts-12</i> у межах МГС	<i>pNts-12</i> поза межами МГС
<i>Acuminatae</i>			
<i>N. acuminata</i>	10,8	2	—
<i>N. attenuata</i>	10,8	2	—
<i>N. corymbosa</i>	10,8	1	—
<i>N. linearis</i>	8,6; 8,5	3/3	—
<i>N. miersii</i>	10,8	1	—
<i>N. pauciflora</i>	10,8	2	—
<i>N. spgazzinii</i>	10,8	1	—
<i>Bigilovianae</i>			
<i>N. bigelovii</i>	11,1	1	—
<i>N. clevelandii</i>	11,1; 10,2	0/1	—
<i>Nudicaules</i>			
<i>N. nudicaulis</i>	9,8; 9,3	2/2	—
<i>Suaveolentes</i>			
<i>N. africana</i>	9,7	1	—
<i>N. amplexicaulis</i>	8,9	1	+
<i>N. benthamiana</i>	9,3	1	+
<i>N. cavicola</i>	9,3; 9,2	1/2	+
<i>N. debneyi</i>	10,0; 9,6	1/1	—
<i>N. eastii</i>	10,5; 9,6	2/1	+
<i>N. excelsior</i>	9,9; 9,2	2/1	+
<i>N. exigua</i>	9,8	2	+
<i>N. fragrans</i>	9,5	1	—
<i>N. goodspeedii</i>	9,8	1	+
<i>N. gossei</i>	9,7; 9,6	1/1	+
<i>N. hesperis</i>	9,4	1	+
<i>N. ingulba</i>	9,4; 9,2	2/2	+
<i>N. maritima</i>	9,2	1	+
<i>N. megalosiphon</i>	10,2; 9,8	2/2	+
<i>N. occidentalis</i>	9,3	2	+
<i>N. rosulata</i>	9,9	2	+
<i>N. rotundifolia</i>	9,9	2	+
<i>N. simulans</i>	9,2	1/1	+
<i>N. suaveolens</i>	9,6	2/1	+
<i>N. umbratica</i>	9,3	2	+
<i>N. velutina</i>	9,2	1	+
Синтетичні амфідиплоїди			
<i>N. didebta</i>			+
<i>N. digluta</i>			+

**pNts-12* — відносна сила гібридизаційного сигналу з цією пробою в межах МГС та поза межами повтору рДНК.

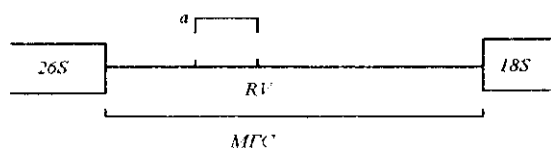


Рис. 1. Схематична організація міжгенного спейсера рДНК *N. tabacum*. MFC — міжгенний спейсер рДНК; RV — рестриктаза EcoRV; a — вставка з проби *pNts-12* розміром біля 1 тис. п. н., що містить 53 п. н. субповтори

тральної частини МГС рДНК *N. tabacum*, люб'язно надану нам М. Борисюком, а також пробу *pUL7* [26]. Клонована послідовність тютюну складається з 53 п. н. субповторів (рис. 1). Пробу *pTa71*, яка містить повний ген рДНК пшениці [27], використовували для виділення генів 26S і 18S рДНК. Розміри гібридизаційних фрагментів визначали, як описано раніше [18]. Маркерами служили *HindIII*-рестриктні фрагменти ДНК фага лямбда.

Результати і обговорення. Для дослідження видоспецифічності ділянки МГС *N. tabacum* (проба *pNts-12*) загальну ДНК видів роду *Nicotiana* обробляли рестриктазами та гібридували з пробами *pUL7* (або *pTa71*) і *pNts-12*. У більшості випадків гібридизаційні сигнали, отримані з обома пробами, мали однакову інтенсивність. Проте зустрічалися і винятки. Проба *pNts-12* давала сильний гібридизаційний сигнал з ДНК *N. tomentosiformis* (рис. 3, е, 3), *N. setchellii* (рис. 3, е, 2), *N. kawakamii*, *N. otophora* (рис. 3, е, 3), *N. tomentosa* (рис. 2, 3), *N. arentsii*, *N. undulata*, *N. palmeri*, *N. trigonophylla* і *N. linearis* (рис. 3, а, 2). Навпаки, послідовності МГС видів *N. longiflora* та *N. plumbaginifolia* (рис. 3, д, 6, 7), *N. clevelandii* (один клас рДНК, рис. 3, ж, 1) показали майже стовідсоткову відсутність гомології до цієї проби. Тільки слабкий гібридизаційний сигнал було отримано між цією пробю та ДНК *N. benavidesii* (один клас рДНК), *N. nesophila* (один клас рДНК), *N. repanda* (один клас рДНК), *N. stocktonii* (один клас рДНК), *N. noctiflora*, *N. petunioides* (рис. 2, з, 5), *N. miersii*, *N. spegazzinii*, *N. corymbosa* (рис. 3, а, 1), *N. bigelovii* (рис. 3, е, 1), *N. amlexicaulis*, *N. benthamiana*, *N. cavicola* (один клас рДНК), *N. debneyi* (рис. 2, а, 1), *N. eastii* (один клас рДНК), *N. excelsior* (один клас рДНК), (рис. 3, ж, 6), *N. fragrans*, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. hesperis*, *N. maritima*, *N. simulans*, *N. suaveolens* (один клас рДНК), (рис. 3, з, 2) і *N. velutina* (таблиця).

У більшості випадків субповтори МГС *N. tabacum* показували «нормальну» гомологію (однакову

силу гібридизаційного сигналу з пробами *pUL7* і *pNts-12*) до ділянок МГС інших видів роду *Nicotiana*. У випадку значно переважаючого сигналу з пробю *pNts-12* можна постулювати ампліфікацію цих типів послідовностей в МГС даного виду. І навпаки, відсутність гомології до цих субповторів у МГС деяких видів свідчить про фіксацію інших типів субповторів у цих ділянках протягом еволюції роду. Механізмами, що відповідають за таку диференційну фіксацію, могли б бути кросинговер на рівні цілого повтору рДНК або ж генна конверсія.

У випадках, коли загальну ДНК деяких видів обробляли сумою рестриктаз *EcoRI* + *BamHI* та гібридували з пробю *pNts-12*, з'являвся неочікуваний фрагмент розміром 23 тис. п. н. (рис. 2, а; рис. 3, з, е, ж,). Наступні гібридизації з 18S чи 26S рДНК пшениці не дали жодного помітного сигналу до цього паттерну. Це означає, що фрагмент 23 тис. п. н. не є результатом неповного рестриктного

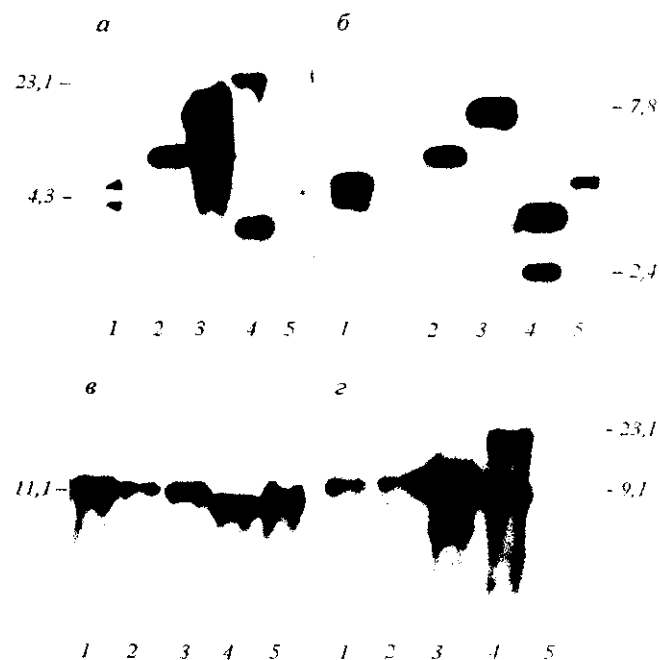


Рис. 2. Гібридизація *BamHI* + *EcoRI* рестриктних фрагментів *N. debneyi* (1); *N. sanderae* (2); *N. tomentosa* (3); *N. acaulis* (4); *N. africana* (5) з пробами *pNts-12* (а) та *pUL7* (б), а також *HindIII* фрагментів *N. bigelovii* (1); *N. solanifolia* (2); *N. glauca* (3); *N. acaulis* (4); *N. africana* (5) з пробами *pUL7* (в) та *pNts-12* (г). Розміри рестриктних фрагментів вказано в тис. п. н.

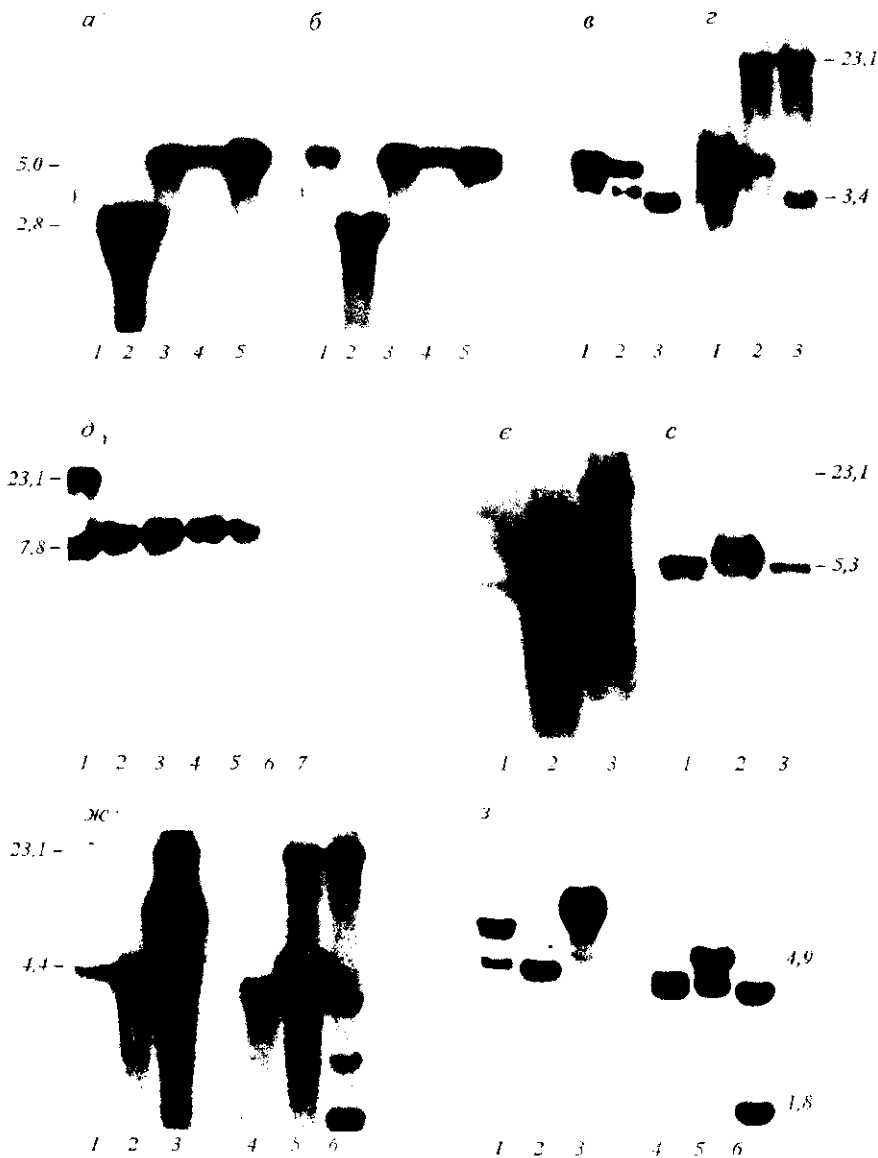


Рис. 3. Гібридизація *Bam*HI + *Eco*RI рестриктних фрагментів *N. corymbosa* (1); *N. linearis* (2); *N. pauciflora* (3); *N. acuminata* (4); *N. attenuata* (5) з пробамі pNts-12 (а) та pUL7 (б); *N. knighthiana* (1); *N. suaveolens* (2); *N. maritima* (3) з пробамі pUL7 (в) та pNts-12 (г); *N. bigelovii* (1); *N. setchellii* (2); *N. tomentosiformis* (3) з пробамі pNts-12 (е) та pUL7 (з); *N. clevelandii* (1); *N. glutinosa* (2); *N. otophora* (3); *N. sylvestris* (4); *N. tabacum* (5); *N. excelsior* (6) з пробамі pNts-12 (ж) та pUL7 (з). а також *Eco*RV + *Hind*III-рестриктних фрагментів *N. langsdorffii* (1); *N. jorge-tiana* (2); *N. bonariensis* (3); *N. sanderac* (4); *N. alata* (6); *N. longiflora* (7); *N. plumbaginifolia* (8) з пробомі pNts-12 (д). Розміри фрагментів вказано в тис. п. н.

гідролізу. Більш того, використання інших рестриктаз (таких, як *Hind*III, *Eco*RV, *Xba*I і *Dra*I) призводило до аналогічного ефекту, що вказує на відсутність або повне метилювання рестриктних сайтів упізнання для даних рестриктаз у межах цієї ділянки. Цей фрагмент не був виявлений серед більшості американських тютюнів, за винятком *N. tabacum* (рис. 3, ж, 5), *N. kawakamii*, *N. otophora* (рис. 3, ж, 3), *N. tomentosiformis* (рис. 3, е, 3), *N. langsdorffii* (рис. 3, д, 1) і *N. acaulis* (рис. 2, а, 12 і 2, г, 4 відповідно). Єдиний африканський пред-

ставник роду також не мав цього фрагмента (рис. 2, а, 5). На противагу, тільки 2 з 21 австралійського тютюну не мали цього фрагмента (*N. fragrans* і *N. debneyi* (рис. 2, а, 1), тоді як для решти видів секції *Suaveolentes* було показано його присутність, наприклад на рис. 3, г, 2, 3; рис. 3, ж, 4, 5). У синтетичних амфідиплоїдів *N. didebta* (*N. tabacum* × *N. debneyi*) і *N. digluta* (*N. tabacum* × *N. glutinosa*) теж присутній фрагмент 23 тис. п. н. (таблиця), який вони успадкували від *N. tabacum*, оскільки у *N. glutinosa* і *N. debneyi* цього фрагмента

немає. Появу рестриктного фрагмента розміром 23 тис. п. н. можна пояснити тільки його локалізацією поза рДНК, тобто послідовності, гомологічні до субповторів ділянки МГС *N. tabacum*, розташовані в інших (не-рДНК) ділянках геному окремих видів. Механізм виникнення таких ділянок залишається невідомим, деякі припущення щодо цього були зроблені раніше [3]. У *Vicia faba* 325 п. н. субповтори МГС показали 75 %-ву гомологію до родини високоповторюваних послідовностей ДНК у гетерохроматичних ділянках геному [4]. Можна припустити, що і в нашому випадку певна родина генів є залученою до обміну з ділянками рибосомних повторів, внаслідок чого послідовності рДНК поширилися у інші, не-рДНК, ділянки геному.

Диференційна видоспецифічна спорідненість субповторів з МГС *N. tabacum* як у межах, так і поза межами повторів рДНК інших тютюнів дозволила зазирнути в еволюційне минуле роду. Перш за все, необхідно постулювати прадавній зв'язок між пре-*Tabacum* і пре-*Petunioides* комплексами або ж незалежне виникнення гібридизаційного фрагмента розміром 23 тис. п. н. у декількох видах секції *Tomentosae*, а також *N. langsdorffii* і *N. acaulis*. Друге припущення є менш імовірним. Звичайно *N. tomentosiformis*, *N. otophora*, *N. tabacum* [6] та *N. kawakamii* мають його внаслідок спільного походження, проте він відсутній як у решти видів секції *Tomentosae*, так і серед видів підроду *Rustica*. *N. setchellii*, за передбаченням Гудспіда [6], міг виникнути в результаті гібридизації *N. glutinosa* і одного з базових видів секції *Tomentosae*. Оскільки серед базових видів секції *Tomentosae* тільки у *N. tomentosa* немає фрагмента розміром 23 тис. п. н., то тільки він, а не *N. tomentosiformis*, *N. kawakamii* чи *N. otophora* міг брати участь у походженні *N. setchellii*.

Згідно з [6], види секції *Alatae* разом з видами секції *Acuminatae* дали початок видам секції *Bigelovianae*. Оскільки останні мають щонайменше один клас рДНК з відсутньою гомологією до субповторів МГС *N. tabacum*, можна припустити, що тільки попередники *N. plumbaginifolia* чи *N. longiflora* (секція *Alatae*) могли виконати цю роль. Більш того, члени секцій *Acuminatae*, *Alatae* і *Noctiflorae* були попередниками сучасних австралійських тютюнів (секція *Suaveolentes*). За припущенням [6], *N. suaveolentes* ($n = 16$), *N. debneyi* і *N. fragrans* (обидва $n = 24$) є сучасними формами тих мігрантів, що досягли Австралії через транс-антарктичний міст, тоді як решта австралійських тютюнів виникла внаслідок численних міжвидових гібридизацій останніх. Згідно з [6], старі таксони півдня

Південної Америки якраз і були попередниками цих мігрантів. Як *N. debneyi*, так і *N. fragrans* у зовнішній морфології несуть риси алятоїдного впливу, тоді як другим батьківським елементом для *N. debneyi* могла би бути раса, близька до акумінатоїдного джерела, а для *N. fragrans* — менш чітко виражена ноктифлороїдна раса. *N. suaveolens* ж містить морфологічні риси як видів секції *Alatae*, так і секції *Noctiflorae* [6]. Оскільки один з класів рДНК *N. suaveolens* має зменшену кількість субповторів, гомологічних до таких *N. tabacum*, можна припустити, що тільки *N. plumbaginifolia* чи *N. longiflora* (секція *Alatae*) могли бути першим батьківським елементом для цього виду, тоді як другим був попередник *N. acaulis*, що містив фрагмент розміром 23 тис. п. н. (секція *Noctiflorae*). Попередники ж *N. noctiflora* і *N. petunioides* (фрагмент розміром 23 тис. п. н. у цих видів відсутній), за твердженням [11], очевидно, є донорами хлоропластного геному австралійських тютюнів. *N. plumbaginifolia* і *N. longiflora* вважаються також можливими попередниками *N. debneyi* та *N. fragrans*, тому що гомологія до субповторів *N. tabacum* майже відсутня в МГС рДНК цих видів. У свою чергу тільки попередники *N. corymbosa*, *N. miersii* чи *N. spagazzinii* (на відміну від решти видів секції *Acuminatae*) через зменшену спорідненість їхніх рДНК до субповторів МГС *N. tabacum* могли б бути другим попередником *N. debneyi*. Решта австралійських тютюнів містять фрагмент 23 тис. п. н., і тому повинні розглядатися як такі, що виникли в результаті гібридизації *N. suaveolens* з *N. debneyi* і *N. fragrans*, що супроводжувалася численними бек-кросами та інтеркросами похідних.

Таким чином, наведені в даній роботі результати показали, що субповтори міжгеного спейсера ядерної рибосомної ДНК *N. tabacum* можна використати для встановлення родинних зв'язків у роді *Nicotiana*.

Автор вдячний А. П. Гребьонкіну, Г. Геде і В. Шулаєву за насіння диких видів тютюну, а також М. Борисюку — за пробу pNts-12.

С. И. Комарницкий

Субповторы межгеного спейсера рибосомной ДНК *Nicotiana*

Резюме

Изучено распространения субповторов с центральной части межгеного спейсера рДНК *Nicotiana tabacum* среди 68 видов рода *Nicotiana* с помощью рестрикционного анализа и блот-гибридизации. Показано, что *N. plumbaginifolia* или *N. longiflora* был донором рДНК видов *N. clevelandii* (*Bigelovianae*), *N. debneyi* и *N. suaveolens* (*Suaveolentes*). Донором второй части ядерного генома *N. debneyi* могли быть *N. corymbosa*, *N. miersii* или *N. spagazzinii*, в то время как для *N. suaveolens* таким видом мог быть *N. acaulis*.

S. I. Komarnytsky

Subrepeats of the intergenic spacer of the *Nicotiana* ribosomal DNA

Summary

Restriction analysis of nuclear DNA combined with the blot-hybridization has been used to determine the distribution of the subrepeats of central part of *Nicotiana tabacum* rDNA intergenic spacer (IGS) among 68 *Nicotiana tabacum* species. It has been shown that the ancestor of *N. plumbaginifolia* or *N. longiflora* may be the donor of *N. clevelandii* (*Bigelovianae*), *N. debneyi* and *N. suaveolens* (*Suaveolentes*) rDNAs. *N. corymbosa*, *N. miersii* or *N. spgazzinii* may be the second nuclear DNA donor for *N. debneyi*, whereas *N. acaulis* may have played this role in the case of *N. suaveolens*.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Long E. O., Dawid I. B. Repeated genes in eukaryotes // *Annu. Rev. Biochem.*—1980.—43.—P. 727—764.
2. Hemleben V., Ganai M., Gerstner J., Schiebel K., Torres R. A. Organization and length heterogeneity of plant ribosomal RNA genes // *The Architecture of Eukaryotic Genes.*—Weinheim: VHC, 1988.—P. 371—384.
3. Schiebel K., von Waldburg G., Gerstner J., Hemleben V. Termination of transcription of ribosomal RNA genes of mung bean occurs within a 175 bp repetitive element of the spacer region // *Mol. and Gen. Genet.*—1989.—218.—P. 302—307.
4. Kato A., Yakura K., Tanifuji S. Repeated DNA sequences found in the large spacer of *Vicia faba* rDNA // *Biochim. et biophys. acta.*—1985.—825.—P. 411—415.
5. Unfried K., Schiebel K., Hemleben V. Subrepeats of rDNA intergenic spacer present as prominent independent satellite DNA in *Vigna radiata* but not in *Vigna angularis* // *Gene.*—1991.—99.—P. 63—68.
6. Goodspeed T. H. The genus *Nicotiana*.—Massachusetts: Waltham, 1954.—536 p.
7. Kostoff D. Cytogenetics of the genus *Nicotiana*. Karyosystematics, genetics, cytology, cytogenetics and phytology of tobacco.—Sofia: State Printed House, (1941—43).—1071 p.
8. 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, N 2.—P. 226—227.
9. Gray J. G. Serological reaction of fraction I proteins from interspecific hybrids in the genus *Nicotiana* // *Plant Syst. and Evol.*—1978.—129, N 1.—P. 177—183.
10. 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.
11. 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.
12. Breiman A. Mitochondrial DNA diversity in the genera of *Triticum* and *Aegilops* revealed by Southern blot hybridization // *Theor. and Appl. Genet.*—1987.—73.—P. 563—570.
13. Комарницький І., Ковтун Е., Глеба Ю. Повторяючіся послідовальності ДНК роду *Nicotiana* // *Цитологія і генетика.*—1994.—28, № 5.—С. 20—27.
14. Evans I. J., James A. M., Barnes S. K. Organization and evolution of repeated DNA sequences in closely related plant genomes // *J. Mol. Biol.*—1983.—170.—P. 803—826.
15. Molnar S. J., Gupta P. K., Fedak G., Wheatcroft R. Ribosomal DNA repeat unit polymorphism in 25 *Hordeum* species // *Theor. and Appl. Genet.*—1989.—78.—P. 387—392.
16. Santoni S., Berville A. Characterization of the nuclear ribosomal DNA units and phylogeny of Beta L wild forms and cultivated beets // *Theor. and Appl. Genet.*—1992.—83.—P. 533—542.
17. Borisjuk N., Borisjuk L., Petjuch G., Hemleben V. Comparison of ribosomal RNA genes within *Solanum* and other *Solanaceae* // *Genome.*—1994.—37.—P. 271—280.
18. Комарницький І., Комарницький С. Поліморфізм довжин рестриктних фрагментів міжгенного спейсеру рибосомальної ДНК деяких видів тютюнів // *Цитологія і генетика.*—1996.—30, № 1.—С. 65—71.
19. Комарницький І., Комарницький С. Варіабельність міжгенного спейсеру рибосомальних ДНК американських видів тютюну // *Цитологія і генетика.*—1996.—31, № 2.—С. 29—36.
20. Borisjuk N. V., Davidjuk Y. M., Kostishin S. S., Miroshnichenko G. P., Velasco R., Hemleben V., Volkov R. A. Structural analysis of rDNA in the genus *Nicotiana* // *Plant. Mol. Biol.*—1997.—35.—P. 655—660.
21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*—1962.—15.—P. 473—497.
22. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucl. Acids Res.*—1980.—8.—P. 4321—4325.
23. Reed K. S., Mann D. A. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes // *Nucl. Acids Res.*—1985.—13.—P. 7207—7221.
24. Church G. M., Gilbert W. Genomic sequencing // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81.—P. 1991—1995.
25. Feinberg A., Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity // *Anal. Biochem.*—1983.—132.—P. 6—13.
26. Колоша В. О., Фодор М. И. Структурная гетерогенность рДНК citrus lemon // *Молекуляр биология.*—1986.—20.—С. 556—662.
27. Gerlach W. R., Bedbrook J. R. Cloning and characterization ribosomal RNA genes // *Nucl. Acids Res.*—1979.—7.—P. 1868—1885.

УДК 577.113:633.71

Надійшла до редакції 02.11.98