

Організація та еволюція генів 5S рРНК у роді *Nicotiana*

С. І. Комарницький, І. К. Комарницький

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

Вивчено організацію генів 5S рРНК у роді Nicotiana. Показано, що ці гени розташовані в кластерах, тандемно повторені та екстенсивно метильовані. Види n=24 плідного рівня переважно характеризувалися двома класами 5S рДНК, тоді як види n=12 плідного рівня — одним, за небагатьма винятками. Серед австралійських видів роду спостерігалася чітка тенденція до еволюції повторів 5S рДНК шляхом узгодженого зменшення їхньої довжини.

Вступ. Гени 5S рРНК вищих рослин організовані у вигляді тандемних кластерів, що повторюються, локалізовані в невеликому числі хромосомних локусів і залишаються висококонсервативними як серед рослинного, так і тваринного царств [1], хоча у деяких грибів ці гени дисперговані по всьому геному [2, 3]. Кожен повтор складається з еволюційно консервативної ділянки гена 5S рРНК та послідовності міжстронного спейсера, яка, як правило, не має високої гомології у представників різних родів [4]. Такий тип організації був підтверджений після з'ясування первинної структури 5S рДНК багатьох рослин, у тому числі пшениці [5], люпину [6], рису [7], гороху [8], петунії [9], жита [10] та сої [11]. Більш того, результати гібридизації по Саузерну свідчать, що подібний тип організації генів 5S рРНК притаманний більш ніж 30 видам вищих рослин [12]. З іншого боку, для рослинних ДНК добре відоме явище метилювання цитозину, коли він зустрічається в послідовностях CpG і CpNpG [13]. За таких обставин, якщо рослинну ДНК обробляти чутливим до метилювання ферментом рестрикції, наприклад *BamHI*, та гібридизувати з пробою 5S рДНК, на авторадіограмі виявляється складна система фрагментів східчастої або ж «драбиноподібної» будови. Причиною її появи є диференційне метилювання послідовностей GpGpArTpCpC. Додатково присутність двох чи більше класів повторів (за довжиною) в геномі одно-

го виду виявляється наявністю подвійних чи потрійних таких драбин [5, 10, 12].

Оскільки аналіз поліморфізму довжин рестриктивних фрагментів (ПДФ) відображає міжвидові відмінності в послідовності ДНК, його визнали як зручне джерело генетичних маркерів для генетичних та селекційних досліджень [14—16]. Види роду *Nicotiana*, які належать до двох плідних рядів і розвиток яких супроводжувався численними міжвидовими гібридизаціями, є природним об'єктом для такого роду досліджень. Рід вигідно вирізняється серед інших рослин тією увагою, яку йому приділяли дослідники. На цей час досить детально охарактеризовані морфологія та цитогенетика роду [17, 18], організація та молекулярна еволюція рубіско [19], хлоропластної [20] та мітохондріальної ДНК [21], повторів 18S—26S рДНК [22], гена 5.8S [23] та послідовності внутрішнього транскрибованого спейсера [24], генів *psbP* фотосистеми II [25]. Разом з тим повтори 5S рДНК *Nicotiana* залишалися зовсім невивченими, на сьогодні відомі лише первинна структура гена 5S рРНК *N. tabacum* [26] та структура повтору 5S рДНК *N. rustica* [27]. У зв'язку з цим у даній роботі ми наводимо дані досліджень з організації та еволюції генів 5S рРНК представників 13 з 14 описаних на сьогодні секцій роду *Nicotiana*.

Матеріали та методи. Загальну ДНК виділяли за методом [28] з листків рослин, вирощуваних у тепличних умовах [29]. Насіння 66 видів роду (таблиця) було отримане від НВО «Табак» (Росія),

КОМАРНИЦЬКИЙ С. І., КОМАРНИЦЬКИЙ І. К.

Характеристика видів роду *Nicotiana* та повторів 5S рДНК

| Підрід Секція | Вид | Кількість хромосом | Розмір |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|--------|
| <i>Rustica</i> | | | |
| <i>Paniculatae</i> | <i>N. benavidesii</i> | 12 | |
| | <i>N. cordifolia</i> | 12 | |
| | <i>N. raimondii</i> | 12 | |
| | <i>N. knightiana</i> | 12 | |
| | <i>N. glauca</i> | 12 | |
| | <i>N. paniculata</i> | 12 | |
| | <i>N. solanifolia</i> | 12 | |
| <i>Rusticae</i> | <i>N. rustica</i> | 24 | 50 |
| <i>Tabacum</i> | | | |
| <i>Tomentosae</i> | <i>N. glutinosa</i> | 12 | |
| | <i>N. kawakamii</i> | 12 | |
| | <i>N. otophora</i> | 12 | |
| | <i>N. tomentosa</i> | 12 | |
| | <i>N. tomentosiformis</i> | 12 | |
| | <i>N. setchellii</i> | 12 | 97 |
| <i>Genuinae</i> | <i>N. tabacum</i> | 24 | 40 |
| <i>Petunioides</i> | | | |
| <i>Undulatae</i> | <i>N. arentsii</i> | 24 | |
| | <i>N. undulata</i> | 12 | 47 |
| | <i>N. wigandioides</i> | 12 | 58 |
| <i>Trigonophyllae</i> | <i>N. palmeri</i> | 12 | |
| | <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. sanderae</i> | 9 | |
| | <i>N. longiflora</i> | 10 | |
| | <i>N. plumbaginifolia</i> | 10 | |
| | <i>N. sylvestris</i> | 12 | 40 |
| | <i>Noctiflorae</i> | <i>N. acaulis</i> | 12 |
| | <i>N. noctiflora</i> | 12 | |
| | <i>N. petunioides</i> | 12 | |
| <i>Acuminatae</i> | <i>N. spagazzinii</i> | 12 | |
| | <i>N. acuminata</i> | 12 | |
| | <i>N. linearis</i> | 12 | |
| | <i>N. attenuata</i> | 12 | |

Закінчення таблиці

| Підрід Секція | Вид | Кількість хромосом | Розмір повтору | Група |
|----------------------|-------------------------|--------------------|----------------|-------|
| <i>Repandae</i> | <i>N. nesophila</i> | 24 | 450 | |
| | <i>N. repanda</i> | 24 | 450 | |
| | <i>N. stocktonii</i> | 24 | 450 | |
| <i>Nudicaules</i> | <i>N. nudicaulis</i> | 24 | 490 | |
| <i>Bigelovianae</i> | <i>N. bigelovii</i> | 24 | 490 | |
| | <i>N. clevelandii</i> | 24 | 490 | |
| <i>Suaveolentes</i> | <i>N. fragrans</i> | 24 | 590 | 1 |
| | <i>N. africana</i> | 23 | 540 | 1 |
| | <i>N. occidentalis</i> | 21 | 340 | 2 |
| | <i>N. amplexicaulis</i> | 18 | 440, 540 | 3 |
| | <i>N. debneyi</i> | 24 | 440, 540 | 3 |
| | <i>N. exigua</i> | 16 | 330, 400 | 4 |
| | <i>N. umbratica</i> | 23 | 280, 320 | 5 |
| | <i>N. rotundifolia</i> | 22 | 280, 340 | 5 |
| | <i>N. benthamiana</i> | 19 | 240, 270 | 6 |
| | <i>N. cavicola</i> | 23 | 240, 270 | 6 |
| | <i>N. excelsior</i> | 19 | 240, 270 | 6 |
| | <i>N. hesperis</i> | 21 | 240, 270 | 6 |
| | <i>N. megalosophon</i> | 20 | 240, 270 | 6 |
| | <i>N. rosulata</i> | 20 | 240, 270 | 6 |
| | <i>N. simulans</i> | 20 | 240, 270 | 6 |
| | <i>N. eastii</i> | 32 | 220, 270 | 7 |
| | <i>N. goodspeedii</i> | 20 | 220, 270 | 7 |
| <i>N. gosseii</i> | 18 | 220, 270 | 7 | |
| <i>N. ingulba</i> | 20 | 220, 270 | 7 | |
| <i>N. maritima</i> | 16 | 220, 270 | 7 | |
| <i>N. suaveolens</i> | 16 | 220, 270 | 7 | |
| <i>N. velutina</i> | 16 | 220, 270 | 7 | |

Інституту генетики та дослідження культурних рослин (Німеччина) та Ратгерс, державного університету Нью-Джерсі (США). Рестриктивний гідроліз та електрофоретичне розділення фрагментів [30], їхнє перенесення [31], внесення радіоактивної мітки [32] та Саузерн-гібридизацію [33] здійснювали згідно з описаними методами. Як пробу використовували *pRIT320*, що містила повний повтор 5S ДНК *Solanum tuberosum*, люб'язно надану

М. В. Борисюком. Молекулярні розміри фрагментів визначали, порівнюючи їх з такими ДНК фага лямбда після гідролізу її рестриктазою *HindIII* за допомогою власної програми GEL.

Результати та обговорення. Якщо загальну ДНК видів роду *Nicotiana* обробляти рестриктазою *BamHI* та гібридизувати з пробом *pRIT320*, на авторадіограмі спостерігається східчате розташування фрагментів (рис. 1, а, б) подібне до того, яке

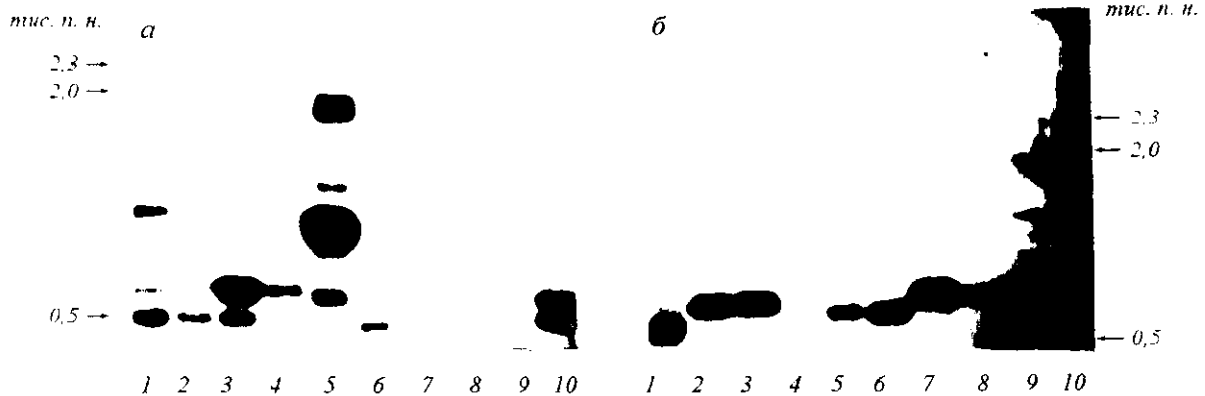


Рис. 1. Блот-гібридизація по Саузерну: а — аналіз структури повторів 5S рДНК *N. corymbosa* (1), *N. attenuata* (2), *N. pauciflora* (3), *N. acuminata* (4), *N. setchellii* (5), *N. nudicaulis* (6), *N. raimondii* (7), *N. paniculata* (8), *N. knighthiana* (9), *N. rustica* (10); б — *N. goodspeedii* (1), *N. petunioides* (2), *N. noctiflora* (3), *N. repanda* (4), *N. bigelovii* (5), *N. stocktonii* (6), *N. cordifolia* (7), *N. benavidesii* (8), *N. trigonophylla* (9), *N. palmeri* (10). Рослинні ДНК обробляли рестриктазою *Bam*HI та гібридизували з пробєю *pRIT320*

тис. п. н.

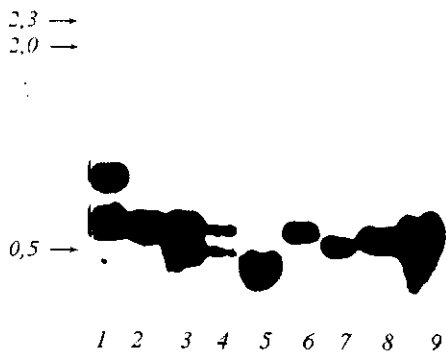


Рис. 2. Блот-гібридизація по Саузерну. Аналіз структури повторів 5S рДНК *N. wigandiioides* (1), *N. arentsii* (2), *N. undulata* (3), *N. rustica* (4), *N. paniculata* (5), *N. knighthiana* (6), *N. raimondii* (7), *N. benavidesii* (8), *N. cordifolia* (9). Рослинні ДНК обробляли рестриктазою *Hae*III та гібридизували з пробєю *pRIT320*

було отримано в інших рослин [12]. Кожна така сходинка представлена одним чи двома фрагментами (відповідно до кількості класів 5S рДНК у даного виду), які повторюються з певним кроком, що дорівнює розміру повтору 5S рДНК. У деяких випадках (наприклад, *N. setchellii*, рис. 1, а, лінія 5) виявляється низькомолекулярний фрагмент, який не входить до суми мономерного повтору. Його поява пояснюється присутністю другого диференційно метильованого *Bam*HI-сайта, внаслідок чого цей фрагмент містить тільки частину повтору 5S рДНК даного виду (другий метильований

*Bam*HI-сайт мають *N. solanifolia*, *N. tomentosa* і *N. knighthiana*). Доказом числа класів 5S рДНК є кількість фрагментів, отримана після рестрикції *Hae*III та гібридизації з пробєю *pRIT320* (рис. 2). Одержане число класів збігалося з таким, отриманим за допомогою *Bam*HI. Розміри повторів 5S рДНК у видів роду (220—1055 п. н.) добре узгоджувалися з раніше опублікованими даними для інших рослин (219—1572 п. н. [12]). *N. setchellii* виявився унікальним видом, довжина повторів 5S рДНК якого становила 973 і 1055 п. н., тоді як довжини повторів решти видів роду не перевищували 850 п. н., а більшість їх знаходилася в межах 220—580 п. н. (таблиця). «Драбиноподібна» система фрагментів не є результатом неповного гідролізу, оскільки навіть п'ятикратна повторна екстракція ДНК та її обробка рестриктазою не змінюють східчастого розташування фрагментів [12]. Кластерне розміщення повторів показаною обробкою ДНК видів роду рестриктазою *Eco*RI та гібридизацією з пробєю *pRIT320*: у результаті отримано високомолекулярний «шмір», що свідчить про відсутність сайтів упізнання до даної рестриктази в межах кластеру 5S рДНК. Величини отриманих розмірів довжин повторів частково узгоджувалися з такими, опублікованими для *N. rustica* [27] і *N. tabacum* [26]. Оскільки розмір кодуєчої ділянки гена 5S рДНК є сталою величиною навіть у віддалених видів [1], ці дані свідчать про значну варіабельність міжгенного спейсера 5S рДНК серед видів роду *Nicotiana*.

Єдиний клас повторів 5S рДНК спостерігали у 37 видів, тоді як 29 видів характеризувалися присутністю двох таких класів (таблиця). Як відомо,

сучасні види роду належать до двох плідних рівнів (гаплоїдні хромосомні числа $n = 12$ і $n = 24$), до яких також відносять і представників двох анеуплоїдних рядів — $n = 9-10$ і $n = 16-23$ відповідно [17]. Цікаво відмітити, що види $n = 12$ плідного рівня характеризуються переважно одним класом 5S рДНК, тоді як види $n = 24$ плідного рівня — переважно двома.

Подібне явище показано і для мультигенної родини генів *psbP* фотосистеми II [25]. Цього слід було б очікувати, адже перехід з $n = 12$ на $n = 24$ плідний рівень відбувся відносно недавно і супроводжувався гібридизацією, коли кожен з батьків привнесив до геному нащадка власний клас повторів 5S рДНК, а короткий час від моменту такого переходу не дозволив елімінувати чи видозмінити один із привнесених класів. Такі види, як *N. setchellii*, *N. undulata*, *N. wigandioides*, *N. sylvestris* та чотири з семи видів секції *Acuminatae* характеризувалися двома класами 5S рДНК попри знаходження на $n = 12$ плідному рівні. Вважають [17], що види цього плідного рівня виникли в результаті першого плідного стрибка, який відбувся на початку еволюції роду, від гіпотетичних попередників $n = 6$ плідного рівня. Проте це сталося так давно, що явища нерівного кросинговеру [34] чи генної конверсії [35], характерні для тандемно розташованих мультигенних родин, сприяли фіксації одного класу 5S рДНК у таких видів. Щодо вищезгаданих видів, то збереження обох класів 5S рДНК у їхніх геномах можна пояснити повторною гібридизацією їх з іншими видами роду чи таким розташуванням у мейозі хромосом, що несуть локуси 5S рДНК, коли ймовірність обміну ділянками ДНК між ними дуже мала [36]. З іншого боку, такі види $n = 24$ плідного рівня, як *N. bigelovii*, *N. clevelandii* і всі три види секції *Repandae*, *N. nudicaulis*, *N. fragrans*, *N. africana* та *N. occidentalis*, містили єдиний клас 5S рДНК. Цей факт можна пояснити наступним чином: названі види походять від попередників з однаковим (за довжиною) класом 5S рДНК або ж виникли в результаті автополіплідії.

Потрібно також відмітити, що довжини повторів 5S рДНК виявилися більшими у видів підродів *Rustica* і *Tabacum* на противагу видам підроду *Petunioides* з секції *Suaveolentes*. Види секції *Paniculatae* характеризувалися незначними змінами у довжині повтору 5S рДНК. *N. rustica*, недавній природний амфідиплоїд між *N. undulata* і *N. paniculata* [17], містив два класи 5S рДНК, один з яких не нагадує такий *N. paniculata*, а інший (розміром 580 п. н.) відповідає більшому класу *N. undulata*. Цікаво, що останні два види секції *Undulatae* *N.*

arentsii і *N. wigandioides* теж містять повтор довжиною 580 п. н., причому *N. arentsii* вважається природним амфідиплоїдом *N. wigandioides* × *N. undulata* [17]. Види секції *Tomentosae* характеризуються єдиним класом 5S рДНК 560 п. н., за винятком *N. glutinosa* і *N. setchellii*. Крім того, *N. tabacum* (*N. tomentosiformis* × *N. sylvestris* [37]) містить повтор такого ж розміру, який він, імовірно, успадкував від *N. tomentosiformis*.

Види секції *Trigonophyllae* містили ідентичний повтор 5S рДНК розміром 570 п. н., тоді як види секції *Alatae* розподілялися на три групи за довжиною повтору 5S рДНК (таблиця): 540 п. н. (*N. alata*, *N. bonariensis*, *N. forgetiana*, *N. langsdorffii*, *N. sanderae*); 450 п. н. (*N. plumbaginifolia*, *N. longiflora*) та 400 і 630 п. н. (*N. sylvestris*). Існування трьох розмежованих груп у межах цієї секції припускалося і раніше [20, 22–24].

Найінтригуючою загадкою в еволюції роду є його поширення з Південної Америки до Австралії, що, за приблизними оцінками, сталося близько 10 мільйонів років тому. Гудспід [17] пояснює таке поширення трансантарктичним мостом, який існував у ті далекі геологічні епохи і з'єднував Південну Америку з Австралією. Проте сучасні геофізичні дані [38] свідчать про те, що вже близько 70 мільйонів років тому ці континенти були розмежовані океанічними водами. Більш того, вузькі ареали двох ендемічних видів *N. fragrans* [17] (п'ять островів архіпелагу Тонга) і *N. africana* [39] (невелике нагір'я в центральній частині Намібії) свідчать на користь іншої гіпотези [40], яка пропонує поширення насіння видів роду океанічними течіями. На основі цитогенетичних досліджень у роді встановлено [17], що види секцій *Alatae*, *Acuminatae* і *Noctiflorae* брали участь у походженні австралійських видів роду *Nicotiana*. Останні мають переважно два класи 5S рДНК і можуть бути згруповані на їхній основі (таблиця). Раніше нами показано, що тільки попередник *N. plumbaginifolia* чи *N. longiflora* серед видів секції *Alatae* міг бути донором частини ядерного геному австралійських видів, тоді як другим попередником міг бути вид, близький до *N. acaulis* з секції *Noctiflorae* [22]. Можна припустити, що менший за розміром клас 5S рДНК австралійських тютюнів походить від такого розміром 440 п. н. *N. plumbaginifolia* чи *N. longiflora*, а більший — розміром 590 п. н. *N. acaulis*. Подальша еволюція повторів 5S рДНК в австралійських тютюнів йшла в бік їхнього узгодженого зменшення (групи 3 → 4 → 5 → 6 → 7, таблиця). З цією схемою не збігаються дані стосовно лише 3 з 22 представників секції *Suaveolentes*: *N. africana* (540 п. н.), імовірно, успадкував його від по-

передників *N. noctiflora* чи *N. petunioides* з секції *Noctiflorae* або ж від видів, близьких до першої групи секції *Alatae* (таблиця), тоді як еволюція повторів 5S рДНК *N. fragrans* (590 п. н.) та *N. occidentalis* (340 п. н.) не дозволяє виявити донора повтору 5S рДНК цих видів у межах даної схеми, проте різко протиставляє вищезазначені види решті видів секції.

Види секції *Acuminatae* мають три класи 5S рДНК довжиною 490, 540 і 600 п. н., по-різному представлені серед них. *N. acuminata* і *N. linearis* містять лише один такий клас (600 п. н.), а *N. spagazzinii* — 490 п. н., тоді як для *N. attenuata*, *N. pauciflora* і *N. corymbosa* є властивими одночасно два класи (490 і 600 п. н.). *N. miersii* має також два класи 5S рДНК, один з яких 490 п. н., а другий 540 п. н. Всі три види секції *Repandae* містять єдиний клас 5S рДНК (450 п. н.), який вони успадкували, очевидно, від попередників *N. sylvestris*, оскільки кластерний аналіз на основі послідовностей внутрішнього транскрибованого спейсера рДНК [24] показав, що саме цей вид є сестринським стосовно кластеру видів секції *Repandae*.

Таким чином, проведені дослідження показали, що у видів роду *Nicotiana*, як і в інших вищих рослин, гени 5S рРНК розташовані в кластерах, тандемно повторені та метильовані. Види $n = 24$ плоїдного рівня характеризуються переважно двома класами 5S рДНК, тоді як види $n = 12$ плоїдного рівня — одним, за небагатьма винятками. Серед австралійських видів роду спостерігалася чітка тенденція до еволюції повторів 5S рДНК шляхом узгодженого зменшення їхньої довжини.

С. І. Комарницький, І. К. Комарницький

Організація і еволюція генів 5S рРНК в роді *Nicotiana*

Резюме

Изучена организация генов 5S рДНК в роде *Nicotiana*. Показано, что эти гены размещены в кластерах, тандемно повторены и экстенсивно метилированы. Виды плоидного уровня $n = 24$ имеют, в основном, два класса 5S рДНК, тогда как виды плоидного уровня $n = 12$ — один, за редким исключением. Среди австралийских видов рода наблюдается четкая тенденция эволюции повторов 5S рДНК путем согласованного уменьшения их длины.

S. I. Komarnytsky, I. K. Komarnytsky

Organization and evolution of the *Nicotiana* 5S rRNA genes

Summary

Structure organization and evolution of 5S ribosomal RNA genes in the genus *Nicotiana* have been studied. These genes have been shown to be clustered, tandem repeated, and extensively methylated. Two classes of 5S rDNA are mainly characteristic for the species of $n = 24$ ploidy level while the species of $n = 12$ ploidy level possess a single class, with the minor exceptions. The tendency of 5S rRNA

repeats to evolve by concerted decrease of their length has been clearly shown in Australian tobaccos.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Long E. O., Dawid I. B. Repeated genes in eukaryotes // Annu. Rev. Biochem.—1980.—43.—P. 727—764.
2. Selker E. U., Morzycha-Wroblewska E., Steven J. N., Metzberg R. L. An upstream signal is required for *in vitro* transcription of *Neurospora* 5S RNA genes // Mol. and Gen. Genet.—1986.—205.—P. 189—192.
3. Mao J., Appel B., Schaack J., Soll D. The 5S genes of *Schizosaccharomyces pombe* // Nucl. Acids Res.—1982.—10.—P. 487—500.
4. Wolters J., Erdmann V. A. Compilation of 5S rDNA and 5S rDNA sequences // Nucl. Acids Res.—1988.—16 (Suppl.)—P. r1—r70.
5. Gerlach W. L., Dyer T. A. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rDNA genes // Nucl. Acids Res.—1980.—8.—P. 4851—4865.
6. Rafalski J. A., Wiewiorowski M., Soll D. Organization and nucleotide sequence of nuclear 5S rRNA genes in yellow lupin (*Lupinus luteus*) // Nucl. Acids Res.—1982.—10.—P. 7632—7642.
7. Hariharan N., Reddy P. S., Padayatty J. D. 5S-rDNA genes in rice embryos // Plant Mol. Biol.—1987.—9.—P. 443—451.
8. Ellis T. H. N., Lee D., Thomas C. M., Simpson P. R., Cleary W. G., Newman M. A., Burcham K. W. G. 5S rDNA genes in *Pisum*: sequence, long range and chromosomal organization // Mol. and Gen. Genet.—1988.—214.—P. 333—342.
9. Frasch M., Wenzel W., Hess D. The nucleotide sequence of nuclear 5S rDNA genes and spacer regions of *Petunia hybrida* // Nucl. Acids Res.—1989.—17.—P. 2857.
10. Reddy P., Appels R. A second locus for the 5S multigene family in *Secale L.*: sequence divergence in two lineages of the family // Genome.—1989.—32.—P. 456—467.
11. Kolchinsky A., Gresshoff P. M. Nucleotide sequence of the 5S rDNA gene from *Glycine soja* // Plant Mol. Biol.—1992.—19.—P. 1045—1047.
12. Gottlob-McHugh S. G., Levesque M., MacKenzie K., Olson M., Yarosh O., Johnson D. A. Organization of the 5S rDNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants // Genome.—1990.—33.—P. 486—494.
13. Gruenbaum Y., Naveh-Many T., Cedar H., Razin A. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA // Nature.—1987.—292.—P. 860—862.
14. Burr B., Evola S. V., Burr F. A., Beckmann J. S. The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding // Genetic engineering: principles and methods / Eds J. K. Setlow, A. Hollaender.—New York: Plenum press, 1983.—P. 45—59.
15. Beckmann J. S., Soller M. Restriction fragment length polymorphism and genetic improvement of agricultural species // Euphytica.—1986.—35.—P. 111—124.
16. Tanksley S. D., Young N. D., Paterson A. H., Bonierbale M. W. RFLP mapping in plant breeding; new tools for an old science // BioTechnology.—1989.—7.—P. 257—264.
17. Goodspeed T. H. The genus *Nicotiana*.—Massachusetts: Waltham, 1954.—536 p.
18. Smith H. H. Recent cytogenetic studies in the genus *Nicotiana* // Adv. Genet.—1968.—14.—P. 1—54.
19. Chen K., Johal S., Wildman S. G. Role of chloroplast and nuclear DNA genes during evolution of fraction I protein // Genetic and biogenesis of chloroplast and mitochondria / Eds T. Bucher, W. Neupert, W. Sebald, S. Werner.—Amsterdam: Elsevier North Holland Biomed., 1976.—P. 3—11.

20. Kung S. D., Zhu Y. S., Shen G. F. *Nicotiana* chloroplast genome III. Chloroplast DNA evolution // Theor. and Appl. Genet.—1982.—61, N 1.—P. 73—79.
21. Комарницький И., Череп Н. Полиморфизм длины рестриктных фрагментов митохондриальной ДНК рода *Nicotiana* // Цитология и генетика.—1994.—28, № 4.—С. 47—59.
22. Комарницький С. І. Субповтори міжгенного спейсера рибосомної ДНК *Nicotiana* // Біополімери и клетка.—2000.—16, № 2.—С. 108—114.
23. Комарницький С. И., Комарницький И. К., Кокс А., Пароконный А. С. Молекулярная филогения ядерных генов 5.8S рибосомальной ДНК 37 видов рода *Nicotiana* // Генетика.—1998.—34, № 7.—С. 883—889.
24. Комарницький С., Комарницький І., Кокс А., Пароконний А. Оцінка достовірності філогенетичного аналізу на основі послідовностей ВТС ядерної рибосомальної ДНК видів роду *Nicotiana* // Цитология и генетика.—1998.—32, № 3.—С. 69—76.
25. Hua S., Dube S. K., Kung S. Molecular evolutionary analysis of the *psbP* gene family of the photosystem II oxygen-evolving complex in *Nicotiana* // Genome.—1993.—36.—P. 483—488.
26. Barciszewska M., Mashkova T., Kisselev L. L., Barciszewski J. The primary structure of maize and tobacco 5S rRNA // FEBS Lett.—1985.—192.—P. 289—293.
27. Venkateswarlu K., Nazar R. A conserved core structure in the 18—25S rRNA intergenic region from tobacco, *Nicotiana rustica* // Plant. Mol. Biol.—1991.—17.—P. 189—194.
28. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acids Res.—1980.—8.—P. 4321—4325.
29. Chaplin J. F., Burk L. G. Plant propagation. *Nicotiana*: procedures for experimental use // Technical bulletin 1586.—New York: Depart. of Agricult., 1979.—P. 28—32.
30. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—560 p.
31. Reed K. S., Mann D. A. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes // Nucl. Acids Res.—1985.—13.—P. 7207—7221.
32. Feinberg A., Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity // Anal. Biochem.—1983.—132.—P. 6—13.
33. Church G. M., Gilbert W. Genomic sequencing // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81.—P. 1991—1995.
34. Flavell R. Sequence amplification, deletion and rearrangement: major sources of variation during species divergence // Genome evolution.—New York: Acad. press, 1982.—P. 301—323.
35. Klein H. L., Petes T. D. Intrachromosomal gene conversion in yeast // Nature.—1981.—289.—P. 144—148.
36. Bennett M. D. The time and duration of meiosis // A discussion on the meiotic process.—Phil. Trans. Roy. Soc. London B.—1977.—277.—P. 201—226.
37. 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.
38. Douglas R. G., Moulade M., Nairn A. E. M. Causes and consequences of drift in the South Atlantic // Implications of the continental drift on the Earth sciences.—London: Acad. press, 1972.—P. 517—537.
39. Merxmuller J., Buttler K. P. *Nicotiana* in Afrikanischen Namiberi Pflanzengeographisches und Phylogenetisches Ratsel // Mitt. Bot. Munchen.—1975.—12.—S. 91—104.
40. Raven P. H., Axelrod D. I. Angiosperm biogeography and past continental movements // Ann. Missouri Bot. Gard.—1974.—61.—P. 539—673.

УДК 577.113:633.71

Надійшла до редакції 22.12.98