

Ю. О. Тинкевич, Р. А. Волков

Новий структурний клас 5S рДНК *Rosa wichurana* Среп.

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. А. Кунахом)

Ділянки геному, що кодують 5S рРНК (5S рДНК), присутні у всіх еукаріотичних організмів і являють собою привабливу модель для дослідження механізмів молекулярної еволюції тандемно організованих повторюваних послідовностей у різних таксономічних групах. З метою з'ясування особливостей молекулярної еволюції 5S рДНК у роді *Rosa* кілька повторюваних одиниць рДНК диплоїдного виду *R. wichurana* (секція *Synstylae*) було клоновано, сиквеновано та порівняно з рДНК інших диплоїдів: *R. nitida* (секція *Carolinae*), *R. rugosa* (секція *Cinnamomeae*), *R. sericea* (секція *Pimpinellifoliae*). Показано, що в геномі *R. wichurana* наявний лише один варіант 5S рДНК, який містить інтактні елементи промотору в міжгенному спейсері (МГС) та, імовірно, є транскрипційно активним. Неочікувано низький рівень подібності (від 52,8 до 57,6%) між послідовностями МГС *R. wichurana* та трьох інших диплоїдних видів свідчить про те, що для представників секції *Synstylae* є характерним новий структурний варіант 5S рДНК і вказує на прискорений темп молекулярної еволюції рДНК у цій секції.

Гени 5S рДНК належать до середньоповторюваних тандемно організованих послідовностей. Вони локалізовані на хромосомах в окремих кластерах, кількість яких становить від 1 до 3 на хромосомний набір. Повторювана одиниця (повтор) 5S рДНК складається з кодуючої ділянки і міжгенного спейсера (МГС). Кодуюча ділянка є еволюційно консервативною, і помітна різниця в її послідовності спостерігається лише при порівнянні віддалених таксонів. Натомість, послідовність МГС швидко накопичує мутації і нерідко значно відрізняється вже на міжвидовому або міжпопуляційному рівні [1].

Нуклеотидні послідовності МГС окремих повторів, які складають один кластер, зазвичай високогомологічні, що є наслідком “вирівнювання” різниці між ними, або гомогенізації. Цей феномен є характерною рисою концертної еволюції, притаманної більшості повторюваних послідовностей [2]. Проте повтори 5S рДНК із різних кластерів гомогенізують набагато гірше, що справедливо, зокрема, і для кластерів алополіплоїдних форм, які походять від різних батьківських видів [1, 3]. Сукупність рис організації 5S рДНК робить її зручною моделлю для вивчення молекулярної еволюції повторюваних послідовностей в різних групах організмів.

Раніше в нашій лабораторії були проведені дослідження організації 5S рДНК трьох диплоїдних представників роду *Rosa* — *R. nitida* Willd, *R. sericea* Lindl. та *R. rugosa* Thunb, які належать до різних секцій цього великого та складного в таксономічному відношенні роду [4–6]. Для проаналізованих видів був зафіксований значний рівень гомології послідовностей МГС, що вказує на їх високу спорідненість та нещодавній за геологічними мірками час дивергенції цих видів. Тому для подальших досліджень з метою аналізу закономірностей еволюції 5S рДНК у таксонів, що знаходяться на більш значних філогенетичних дистанціях, був обраний далекосхідний диплоїдний вид — *R. wichurana* Среп, що представляє більш віддалену секцію роду *Rosa* — *Synstylae* [7].

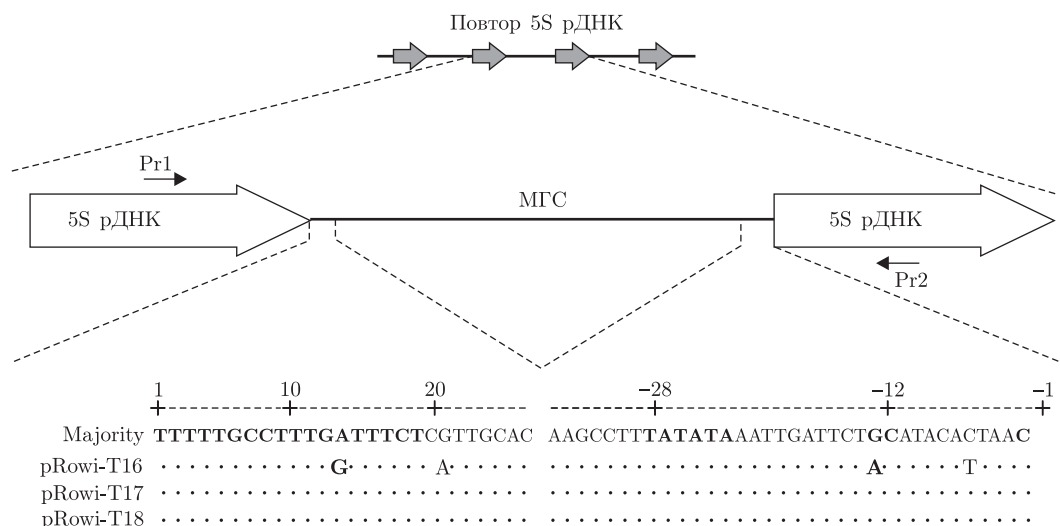


Рис. 1. Структурна організація 5S рДНК *Rosa wichurana*. Наведено фрагменти вирівнювання нуклеотидних послідовностей МГС, що містять регуляторні елементи. Стрілками вказано розташування праймерів Pr1 та Pr2. Напівжирним шрифтом виділено мотиви зовнішніх регуляторних елементів промотору та термінатор

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження був зразок *R. wichurana*, наданий ботанічним садом Чернівецького національного університету. Загальну ДНК екстрагували згідно зі стандартним протоколом [8, 9].

Повторювану одиницю 5S рДНК ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), отримані ампліфікати клонували в плазмідний вектор pLitmus 38i як було описано раніше [1, 4]. Застосовані для ПЛР праймери забезпечують ампліфікацію повного МГС та фланкуючих ділянок кодуючої послідовності (рис. 1).

Рекомбінантні плазмідні, що містили інсerti 5S рДНК, сиквенували з використанням Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit на сиквенаторі ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems, США). Первинну обробку отриманої нуклеотидної послідовності проводили за допомогою пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Clustal V.

Результати та їх обговорення. Загалом було отримано п'ять клонів рекомбінантних плазмід, що містили інсerti 5S рДНК *R. wichurana*. Рестриктазний аналіз цих плазмід показав, що обробка *Eco52* I призводить до утворення двох фрагментів ДНК різного розміру. Високомолекулярний фрагмент мав довжину приблизно 2800–2900 н. п., що відповідає розміру лінійної форми вектора pLitmus 38i. Фрагмент меншого розміру мав довжину приблизно 530 н. п., що відповідає розміру ампліфікатів 5S рДНК *R. wichurana*.

Для інсертів із трьох клонів було визначено нуклеотидну послідовність. Довжина клонуваних повторюваних ділянок 5S рДНК *R. wichurana* становила 535 н. п. для клону pRowi-T16, 524 н. п. для pRowi-T17 та 537 н. п. для pRowi-T18. Такі розміри повторів є типовими для представників роду *Rosa* [4–6].

Аналіз отриманих послідовностей показав, що всі три клони містять послідовність МГС, фланковану з обох сторін фрагментами кодуючої ділянки 5S рДНК. Безпосередньо з полілінкерними частинами вектора межують послідовності праймерів, використаних при проведенні ПЛР. За результатами визначення меж кодуючої ділянки встановлено розміри МГС для клонів pRowi-T16, pRowi-T17 та pRowi-T18 — 423, 412 та 425 н. п. відповідно.

Вирівнювання отриманих нуклеотидних послідовностей показало практично повну ідентичність кодуючих ділянок як між клонами *R. wichurana*, так і порівняно з іншими представниками роду. На противагу цьому, в МГС було знайдено значну кількість одно- та багатонуклеотидних інсерцій/делецій та точкових нуклеотидних замін, що відрізняє МГС *R. wichurana* від МГС досліджених раніше видів *Rosa*.

За результатами вирівнювання нуклеотидних послідовностей був встановлений рівень подібності між МГС досліджених клонів (табл. 1). Цей показник для різних клонів *R. wichurana* становить від 91,7 до 95,4%. Такий рівень внутрішньогеномної гомології послідовностей МГС є помітно нижчим за аналогічні показники для *R. rugosa* (99,1%) та *R. nitida* (від 97,9 до 99,5%).

Проте найбільшою несподіванкою виявився низький рівень гомології між МГС *R. wichurana* та інших трьох видів роду *Rosa*, що становить від 52,8 до 57,6%. Такі низькі значення гомології при порівнянні МГС видів, що належать до одного роду, раніше не спостерігались. Так, наприклад, рівень подібності між нуклеотидними послідовностями МГС 5S рДНК різних видів всередині родів *Nicotiana* та *Astragalus* є вищим за 80 та 70% відповідно [3, 10].

Причиною низького рівня подібності клонованих повторів 5S рДНК *R. wichurana* та підвищеної кількості мутацій в їх МГС, порівняно з повторами з геномів інших видів *Rosa*, могло б бути їх перетворення в нефункціонуючі псевдогени [11]. Для перевірки цього припущення ми вважали доцільним визначити, чи в МГС отриманих клонів присутні мотиви, необхідні для ініціації транскрипції.

Було встановлено, що в МГС всіх клонів 5S рДНК *R. wichurana* присутні сигнали, що відповідають зовнішнім регуляторним елементам промотору РНК-полімерази III, характерним для 5S рДНК [12]. До таких сигналів належить шестинуклеотидний мотив ТАТАТА, розміщений на 3' кінці МГС в позиції –28 н. п. від 5' кінця кодуючої ділянки, а також мотиви GC та C в позиціях –12 н. п. та –1 н. п. відповідно (див. рис. 1). Із трьох досліджених клонів лише у pRowi-T16 виявлена нуклеотидна заміна в мотиві GC. Також безпосередньо після 3' кінця кодуючої ділянки розташована оліго-Т послідовність, що виконує функцію термінатора транскрипції РНК-полімерази III [12]. Таким чином, у МГС 5S рДНК *R. wichurana* виявлено всі типові транскрипційно важливі мотиви (див. рис. 1).

Наявність у МГС усіх регуляторних елементів транскрипції разом з відсутністю мутацій у кодуючій ділянці 5S рДНК *R. wichurana* суперечить припущенню про переродження цих

Таблиця 1. Рівень подібності (%) МГС 5S рДНК представників роду *Rosa*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	№ клону
100	98,3	96,3	97,5	96,3	96,2	44,4	43,8	38,3	1
	100	96,3	97,5	96,3	96,2	44,2	43,3	43,5	2
		100	99,5	99,5	92,9	42,0	40,3	40,3	3
			100	99,5	93,4	41,6	40,1	40,6	4
				100	92,9	42,0	40,3	40,3	5
					100	44,0	43,5	43,0	6
						100	92,6	92,8	7
							100	97,0	8
								100	9

Примітка. Для порівняння було використано послідовності МГС 5S рДНК *R. rugosa* (1 – pRoru-T1; 2 – pRoru-T54 [6]); *R. nitida* (3 – pRoni-T30; 4 – pRoni-T32; 5 – pRoni-T33 [4]); *R. sericea* (6 – pRoser-T53 [5]) та *R. wichurana* (7 – pRowi-T16; 8 – pRowi-T17; 9 – pRowi-T18).

	→	→	→	→
<i>Rosa wichurana</i>	TTGGCC	TTGGGCC	TTGGGGCTC	TTGGGCTTG
<i>Rosa nitida</i>	-----
<i>Rosa rugosa</i>
<i>Rosa sericea</i>A.....
<i>Acaena cylindristachya</i>	.G....
<i>Acaena latebrosa</i>	.G....	-----G.....
<i>Cliffortia arborea</i>	.G....	-----
<i>Cliffortia montana</i>	.G...G	-----
<i>Sanguisorba officinalis</i>	.A....	-----

Рис. 2. Порівняння первинної нуклеотидної послідовності зони субповторів у центральній частині МГС 5S рДНК представників роду *Rosa* та підроддини *Rosoideae*. GenBank Acc. Nos: *Acaena cylindristachya* (EU931697); *Acaena latebrosa* (EU931698); *Cliffortia arborea* (EU931700); *Cliffortia graminea* (EU931711); *Sanguisorba officinalis* (EU931696.1)

послідовностей у псевдогени. Отже, можна стверджувати, що нами ідентифікований новий, імовірно, більш рідкісний, функціонально активний клас повторів 5S рДНК, притаманний деяким видам роду *Rosa*. Низький рівень подібності з МГС інших представників роду вказує на стрибкоподібний характер еволюції 5S рДНК шляхом швидких структурних перебудов у минулому.

Подальший аналіз особливостей організації МГС *R. wichurana* дав можливість виявити в його складі дві ділянки підвищеної подібності до МГС інших видів *Rosa*. Одна з цих ділянок містить згадані вище регуляторні елементи РНК-полімерази III, а інша локалізується в центральній частині МГС і складається із чотирьох коротких субповторів (рис. 2). Ця еволюційно консервативна ділянка була раніше знайдена нами в інших видів *Rosa* та в деяких представників підроддини *Rosoideae* [6].

Можливим механізмом виникнення субповторів, аналогічних тим, що знаходяться в центральній консервативній ділянці МГС, вважається “проковзування нитки” ДНК під час реплікації [13]. Теоретично поява невеликої ділянки субповторів може статися протягом кількох клітинних циклів, тобто за дуже короткий за еволюційними масштабами час. Ідентичні при виникненні субповтори в подальшому накопичують мутації зі швидкістю, характерною для ділянки ДНК, в якій вони локалізовані [14]. Наявність ідентичних мутацій у зоні субповторів у представників підроддини *Rosoideae* показує, що ця зона деякий час еволюціонувала за типовою моделлю, але з часом зазнала консервації в спільного предка всієї групи. Така еволюційна подія виглядає несподіваною, адже для центральної частини МГС, в якій локалізована зона субповторів, невідомі регуляторні або будь-які інші функції. Отже, мутації в ній повинні мати нейтральний характер і не елімінуватися добром. Розуміння механізмів і причин еволюційної консервації зони субповторів у МГС потребує подальших досліджень із використанням даних для більшої кількості представників підроддини *Rosoidea* та проведенням порівняння з еволюцією МГС 5S рДНК в інших групах вищих рослин.

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. – **103**. – P. 1273–1282.
2. Coen E. S., Thoday J. M., Dover G. Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster* // Nature. – 1982. – **295**, No 5850. – P. 564–568.
3. Fulnecek J., Lim K. Y., Leitch A. R. et al. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species // Heredity. – 2002. – **88**. – P. 19–25.
4. Тинкевич Ю. О., Волков Р. А. Структурна організація 5S рибосомальної ДНК *Rosa nitida* Wild. // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – **9**, № 2. – С. 276–282.

5. Тынкевич Ю. О., Волков Р. А. Структурна організація повторюваної ділянки 5S рДНК *Rosa sericea* Lindl. // Біол. системи. – 2011. – **3**, № 4. – С. 315–321.
6. Тынкевич Ю. О., Волков Р. А. Structural organization of 5S ribosomal DNA of *Rosa rugosa* // Cytol. Genet. – 2014. – **48**, No 1. – P. 3–9.
7. Wisseman V., Ritz C. M. The genus *Rosa* (Rosoidae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nr ITR-I and atp B – rbcL intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy // Botan J. Linn. Soc. – 2005. – **147**. – P. 275–290.
8. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. – 1985. – **5**. – P. 69–76.
9. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – Vol. 1–3.
10. Ma X. Q., Duan J. A., Zhu D. Y. et al. Species identification of Radix Astragali (Huangqi) by DNA sequence of its 5S-rRNA spacer domain // Phytochem. – 2000. – **54**. – P. 363–368.
11. Takahata N., Kimura M. A model of evolutionary base substitutions and its application with special reference to rapid change of pseudogenes // Genetics. – 1981. – **98**. – P. 641–657.
12. Douet J., Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis* // Heredity. – 2007. – **99**. – P. 5–13.
13. Christian S., Diethard T. Slippage synthesis of simple sequence DNA // Nucl. Acid. Res. – 1992. – **20**, No 2. – P. 211–215.
14. Kruglyak S., Durrett R. T., Schug M. D., Aquadro C. F. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – **95**. – P. 10774–10778.

Чернівецький національний університет
ім. Юрія Федьковича

Надійшло до редакції 01.10.2013

Ю. О. Тынкевич, Р. А. Волков

Новый структурный клас 5S рДНК *Rosa wichurana* Среп.

Участки генома, кодирующие 5S рРНК (5S рДНК), присутствуют во всех эукариотических организмах и представляют собой интересную модель для исследования механизмов молекулярной эволюции тандемно организованных повторяющихся последовательностей в различных таксономических группах. С целью уточнения особенностей молекулярной эволюции 5S рДНК в роде *Rosa* несколько повторяющихся единиц рДНК диплоидного вида *R. wichurana* (секция *Synstylae*) были клонированы, секвенированы и сопоставлены с рДНК других диплоидов: *R. nitida* (секция *Carolinae*), *R. rugosa* (секция *Cinnamomeae*) и *R. sericea* (секция *Pimpinellifoliae*). Показано, что в геноме *R. wichurana* присутствует только один вариант 5S рДНК, который содержит интактные элементы промотора в межгенном спейсере (МГС) и, вероятно, является транскрипционно активным. Неожиданно низкий уровень сходства (от 52,8 до 57,6%) между последовательностями МГС *R. wichurana* и трех других диплоидных видов свидетельствует о том, что для представителей секции *Synstylae* характерен новый структурный вариант 5S рДНК, и указывает на ускоренный темп молекулярной эволюции рДНК в этой секции.

Yu. O. Tynkevich, R. A. Volkov

Novel structural class of 5S rDNA of *Rosa wichurana* Crep.

Genomic region encoding 5S rRNA (5S rDNA) is present in all eukaryotic organisms and represents an attractive model for investigating the mechanisms of molecular evolution of tandem arranged repeated sequences in various taxonomic groups. In order to clarify the molecular evolution of 5S rDNA in genus Rosa, several rDNA repeated units of diploid species R. wichurana (sect. Synstylae) were cloned, sequenced, and compared with rDNA sequences of other diploids: R. nitida (sect. Carolinae), R. rugosa (sect. Cinnamomeae), and R. sericea (sect. Pimpinellifoliae). It has been revealed that only one variant of 5S rDNA, which contains intact promoter elements in the intergenic spacer region (IGS) and appears to be transcriptionally active is present in the genome R. wichurana. A level of sequence similarity (from 52.8 to 57.6%) between the IGS of R. wichurana and three other diploid species is unusually low, demonstrating that a novel structural variant of 5S rDNA is characteristic of representatives of sect. Synstylae and suggesting the accelerated rate of rDNA molecular evolution in the section.