

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНІВ 5S
рРНК ВИДІВ РОДУ *GENTIANA* L.**

В. М. Мельник, І. О. Андрєєв, Г. Ю. Мирюта, В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
E-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

У вищих рослин ядерні гени 5S рибосомної РНК (або 5S рДНК) організовані в один або кілька кластерів тандемно повторюваних послідовностей розміром від 200 до 900 п.н. Кодувальні частини сусідніх рибосомних повторів розділяє ділянка нетранскрибованого спейсера (НТС), яка несе сигнали ініціації і термінації транскрипції. НТС є найбільш варіабельною частиною рибосомного повтору. Особливості будови генів рРНК – багатокопійність, кластерна організація, висока консервативність кодувальних ділянок і варіабельність спейсерних послідовностей, а також наявність механізмів, що забезпечують узгоджену еволюцію повторів рДНК всередині кластера, роблять їх зручною моделлю для з'ясування питань екології, популяційної генетики, селекції і систематики [1-3].

Тирлич (*Gentiana* L.) – типовий рід родини Gentianaceae Juss., який включає близько 400 видів [4]. Це складний у систематичному відношенні таксон, чим і пояснюється відсутність загально визнаної системи даного роду. Остаточне не вирішеними залишаються питання обсягу роду *Gentiana*, систематичної цінності ознак, ступеня їх мінливості та таксономічного статусу окремих поліморфних видів.

Проведено порівняльний аналіз послідовностей генів 5S рРНК з метою визначити особливості еволюції ділянки міжгенного спейсера та уточнити філогенетичні зв'язки представників роду *Gentiana* флори України.

Матеріалом для дослідження слугували рослини трьох видів тирличів, які відносяться до різних секцій та відрізняються за морфологією, анатомією, умовами зростання та ін. Зразки *G. acaulis* L., *G. lutea* L., *G. asclepiadea* L. були взяті з природних

місць зростання в Україні.

Виділення ДНК, гідроліз ДНК ендонуклеазою рестрикції HindIII, електрофорез в агарозному гелі, ампліфікацію НТС 5S рДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції проводили, як описано раніше [3].

Отримані ПЛР-продукти розділяли за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, вирізали та очищали від агарози з використанням набору реагентів Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («MBI Fermentas», Литва). Виділені фрагменти ДНК після гідролізу HindIII ендонуклеазою рестрикції лігували в плазмідну рUC18. Отримані плазмідні конструкції клонували в *E. coli*. Секвенування клонуваних послідовностей проводили із використанням зворотнього M13-праймера в фірмі GATC-Biotech (Нідерланди). Аналіз отриманих послідовностей проводили у програмі Unipro UGENE [5].

Секвенування двох клонів НТС гена 5S рРНК *G. acaulis* показало, що довжина спейсера становить 501 п.н. Порівняльний аналіз визначених послідовностей та ще однієї послідовності НТС 5S рДНК цього ж виду, знайденої у базі даних GenBank (EF626794), показав високий рівень гомології між ними. Так, для двох клонів НТС 5S рДНК *G. acaulis* з Українських Карпат знайдено менше 1 % поліморфних нуклеотидів (3 з 501), у рослини з Альп знайдено додатково 5 варіабельних нуклеотидів. Виявлені відмінності відносилися до замін типу G/C та C/T. Три з п'яти поліморфних нуклеотидів, що відрізняють рослини з Альп та Карпат, утворюють групу: TACT/CGCC. Отримані дані свідчать про високу внутрішньовидову консервативність НТС 5S рДНК *G. acaulis*, хоча для остаточного підтвердження цього потрібен аналіз розширеної вибірки зразків з інших місць зростання.

Для *G. asclepiadea* було отримано шість клонів НТС гена 5S рРНК, довжина чотирьох з них становила 463 п.н. Рівень гомології між ними складав 98–100%. Два інші клони НТС 5S рДНК мали довжину ~800 п.н. Встановлено, що причиною появи класу повторів більшого розміру є дуплікація ділянки НТС довжиною 312 п.н.

Два клони НТС гена 5S рРНК *G. lutea* мали розмір 453 та

240 п.н. Подібність відповідних ділянок НТС цих клонів була значно меншою, ніж у *G.acaulis* і *G.asclepiadea*, й становила 93 %.

Проведено порівняльний аналіз клонованих послідовностей НТС ядерного гена 5S рРНК вивчених видів з аналогічними послідовностями геному інших видів тирличів з бази даних GenBank. Порівняльний аналіз 22 клонів 14 видів з 5 секцій роду *Gentiana* показав високу (>98 %) гомологію клонів одного виду (навіть з віддалених популяцій двох різних гірських масивів), а також високу міжвидову варіабельність. На основі проведеного порівняльного аналізу послідовностей НТС генів 5S рРНК тирличів визначено філогенетичні відносини між дослідженими видами та секціями всередині роду *Gentiana*.

На дендрограмі, побудованій за алгоритмом Nighbour Joining, групування видів відбулося згідно визначених раніше секцій в межах роду. Виключення становив вид *G.asclepiadea*, який не потрапив у секцію *Pneumonanthe* разом з *G.triflora*, *G.scabra* і *G.manshurica*.

Таким чином, досліджено міжвидовий поліморфізм генів 5S рРНК деяких представників роду *Gentiana* флори України. Клоновано, секвеновано та проведено аналіз послідовності нетранскрибованого спейсера 5S рДНК трьох видів тирличів. Проведено порівняльний аналіз отриманих послідовностей та послідовностей з бази даних GenBank, який дозволив отримати додаткові дані щодо філогенетичних відносин окремих представників роду.

Література

1. *Куприянова Н.С.* Консервативность и изменчивость рибосомной ДНК эукариот / Н.С. Куприянова // Молекулярная биология. — 2000. — Т. 34, № 5. — С. 753–765.
2. *Волков Р.А.* рДНК рослин: організація, еволюція, застосування / Волков Р.А., Панчук І.І., Борисюк Л.Г., Борисюк М.В. // Цитология и генетика. — 2003. — Т. 37, № 1. — С. 72–78.
3. *Мельник В.М.* Поліморфізм ядерної 5S рибосомної ДНК

деяких видів роду *Gentiana* L. / В.М. Мельник // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2013. — Т. 11, № 1. — С. 92—95.

4. Ho T.-N., Liu S.-W. The infrageneric classification of *Gentiana* (Gentianaceae) // Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.), Bot. — 1990. — Vol. 20, № 2. — P. 169—192.
5. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. — 2012. — Vol. 28. — P. 1166—1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091

УДК 577.12:582.923.1

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ ФЛАВОНОЇДІВ
І КСАНТОНІВ У РОСЛИНАХ І КУЛЬТУРІ ТКАНИН
GENTIANA ASCLEPIADEA L.**

М. І. Пантелеймін, М. З. Мосула, Н. М. Дробик

Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка

E-mail: maryanamosula@gmail.com

Сучасний розвиток промисловості і сільського господарства, збільшення чисельності населення в багатьох регіонах світу, науково-технічний прогрес і господарська діяльність людини здійснюють суттєвий вплив на навколишнє середовище. Під такий негативний вплив попадають і рослини як складовий компонент біоценозів. Інтенсивне викопування рослин з лікувальними цілями, неконтрольоване випасання худоби, витопування та зривання генеративних пагонів, спричинюють зменшення чисельності особин, зміни вікової та просторової структури популяцій рослин, порушення їх динаміки і стабільності.

Основною сировиною для фармацевтичної промисловості, незважаючи на значні досягнення хімії синтезу, продовжують залишатись лікарські рослини – близько 40 % усіх лікарських препаратів виготовляють із рослинної сировини. Науково