

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

На правах рукопису

ВОЛКОВ РОМАН АНАТОЛІЙОВИЧ

МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНІ
ПРОЦЕСИ І КАРІОТИПІЧНА
ЕВОЛЮЦІЯ РОСЛИН

03.00.26 – молекулярна генетика

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 1995

АВ 33, (30)

Робота виконана на кафедрі біохімії Чернівецького
державного університету ім. Ю.Федьковича

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,
професор В.А.КУНАХ

доктор біологічних наук,
професор, Ю.М.СИВОЛАП

доктор біологічних наук,
професор, М.Ф.СТАРДУБ

Провідна установа: Харківський державний університет

Захист дисертації відбудеться *23.09.1996* р.
о *14.* годині на засіданні Спеціалізованої вченої ради
Д 01.86.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН
України за адресою (252143, м.Київ, вул. Заболотного, 150).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
молекулярної біології і генетики НАН України.

Автореферат розіслано *19.09.1996* року.

Вчений секретар
Спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук

А.Л.Лукаш

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00779355 (-)

ДВ-33.732

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. На основі досягнень біохімії і молекулярної біології за останні два десятиліття сформувалися принципово нові уявлення про організацію і еволюцію геному еукаріот. Так, були детально описані "стрибаччі гени" (зокрема - у кукурудзи) [Хесин, 1984; Финнеган и др., 1986], обґрунтовані уявлення про неканонічні функції ДНК ("скелетна" ДНК [Cavalier-Smith, 1982], "егаїстична" і "сміттева" ДНК [Дуллитл, 1986]), запропонована теорія нейтральності [Кижура, 1985]. Було доведено, що геном знаходиться у стані постійного спонтанного поновлення набору складаючих його паліндуристичних послідовностей (зокрема - тих, що повторюються: ПП) в результаті періодичних циклів делецій/ампліфікацій [Flavell, 1984; Флейвелл, 1990]. Наслідком цього "кругообігу" ДНК і зв'язаного з ним феномену узгодженої (концертної) еволюції є існування так званого еволюційного "молекулярного двигуна" [Dover et al., 1986]. Проте, наявні еволюційні теорії в основному ґрунтуються на генетичних уявленнях, що склалися ще в середині століття [Четвериков, 1926; Майр, 1980]. Зокрема, недооцінюється значення для еволюції особливостей організації і мінливості геному [Dover et al., 1986].

Характерною рисою еволюції покритонасінних рослин є зв'язок видоутворення з перебудовами каріотипу (ало- та автополіплоїдія, анеуплоїдія та гаплоїдія, [Грант, 1984; Готтшак, 1985]. Але ці явища все ще не отримали гідного пояснення в рамках існуючих еволюційних концепцій [Воронцов, 1980; Солбриг, 1982].

До початку нашої роботи були наявні лише окремі дані про особливості організації і функціонування геному у віддалених гібридів рослин. Молекулярно-біохімічні основи анеуплоїдії і гаплоїдії були також практично не вивчені. Взагалі, робіт, в яких цілеспрямовано вивчався б взаємозв'язок між молекулярною і хромосомною еволюцією все ще дуже мало, хоча їх теоретична і практична важливість не викликає сумнівів.

В зв'язку зі сказаним вище метою роботи було вивчення молекулярно-біохімічних передумов і наслідків каріотипічної еволюції у рослин (зміна рівня плідності, кількості і морфології хромосом). В ході роботи вирішувалися такі експериментальні завдання:

1. Вивчити вплив зміни рівня плідності на синтез РНК і білків у кукурудзи;

ЛНБ ім. В. Стефанька
АН України

2. Дослідити взаємозв'язок між еволюцією ПП і перетворенням хромосом (зокрема - в зв'язку з анеуплоїдією і алополіплоїдією) для груп рослин, що різняться характером еволюції каріотипу (роди *Nicotiana* і *Prunus*):

3. Вивчити організацію, рівень мінливості і характер успадкування рДНК при міжвидовій гібридизації у *Nicotiana* і *Prunus*;

4. Провести визначення нуклеотидних послідовностей ВМС рДНК диплоїдних батьківських видів *N. sylvestris* і *N. tomentosiformis* і співставити їх з послідовністю ВМС дочірнього алететраплоїдного *N. tabacum*.

Нацкова новизна і практичне значення роботи. На основі порівняльного вивчення рослин різного рівня плідності показано, що інтенсивність синтезу РНК і білків знижується при збільшенні плідності. Отримані результати підтверджують гіпотезу, згідно якої визначальне значення має співвідношення об'єму ядра і площі його поверхні.

Проведено вивчення ступеня дивергенції ПП у представників род. *Solanaceae* і *Rosaceae* (роди *Nicotiana*, *Prunus* і споріднені роди). Встановлено, що в еволюції роду *Nicotiana* процеси оновлення наборів ПП протікали з високою швидкістю, а в роді *Prunus* - з низькою. Інтенсивність делецій/ампліфікацій пов'язана з перебудовами каріотипу, а саме - числа і морфології хромосом. Показано, що при рівні гомології ПП 75% і вище можливе міжвидове схрещування на диплоїдному рівні (рекомбінаційне видоутворення). При нижчому рівні подібності наборів ПП можливе одержання тільки алоплоїдних гібридів. ПП предкових видів піддаються перебудовам в геномі алоплоїдних гібридів.

Вперше здійснено детальне рестриктне картування рДНК 32 видів родів *Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum*, *Datura*, *Lycium*, *Prunus*. Показано, що у вивчених групах спостерігається істотна різниця за довжиною ВМС, що пов'язано з різною кількістю субповторів. Аналіз можливих причин, що визначають характер мінливості ВМС за довжиною, показав, що його збільшення в процесі еволюції не мало адаптивного значення, але було пов'язано з посиленням процесів ампліфікації при перебудовах каріотипу. У алоплоїдних гібридів виявлені три варіанти успадкування рДНК: а) збереження рДНК обох батьків (*Nicotiana*, *Prunus*); б) збереження рДНК одного з батьків і елімінація рДНК іншого (*Prunus*); в) поява нового варіанту рДНК внаслідок перетворення рДНК одного з батьківських видів (*Nicotiana*).

Методами геносистематики уточнені філогенетичні зв'язки і таксономічний статус для *Nicotiana* і *Prunus*, підтверджені гіпотези про алоплідне походження *N. tabacum*, *P. domestica*, *P. cerasus*.

Вперше проведене розшифровування нуклеотидних послідовностей ВМС рДНК *N. tomentosiformis* і *N. sylvestris* (ці послідовності зареєстровані в міжнародних комп'ютерних базах даних (EMBL, GenBank and DDBJ Nucleotide Sequence Databases під No X76055 та X76056). Комп'ютерний аналіз розшифрованих послідовностей показав, що у ВМС рДНК *N. tomentosiformis* і *N. sylvestris* є по сім областей, кожна з яких має видоспецифічні структурні особливості і різниться від інших швидкістю молекулярної еволюції. У ВМС рДНК *Nicotiana* знайдено 4 типи субповторів, запропонована схема їхньої еволюції. Показано, що міжвидова різниця за довжиною ВМС в основному пов'язана із кількістю субповторів в областях II і VI. Проведений комп'ютерний пошук можливих вторинних структур у ВМС, який показав, що існування шпилькових структур найбільш імовірно в транскрибованій частині спейсера. Встановлений компенсаторний характер нуклеотидних замінів, що сприяло збереженню шпилькових структур в процесі еволюції. Майже всі сім областей ВМС *Nicotiana* демонструють гомологію з відповідними ділянками ВМС інших представників родини Solanaceae. Це дозволяє говорити про спільність принципів організації рДНК в цій родині. Показано, що TIS (послідовність TATATAAGGGGGG) практично ідентичний у всіх вищих рослин; у представників родини Solanaceae значна подібність виявлена і для послідовностей, що оточують TIS.

Вперше детально вивчено успадкування рДНК у природного алоплідного гібриду (*N. tabacum*) з достовірно встановленими предковими видами (*N. tomentosiformis* і *N. sylvestris*). Показано, що у гібриду збереглася рДНК, успадкована від *N. tomentosiformis*. Імовірною причиною чого є великий розмір ВМС. В подальшому ця рДНК піддалася ряду перетворень, пов'язаних з делецією частини субповторів в зоні II і ампліфікацією - в зоні VI.

Одержані результати можуть бути використані в дослідженнях по вивченню організації, експресії і еволюції геному, видоутворення, систематики і таксономії вищих рослин, а також - при читанні курсів лекцій з біохімії і молекулярної біології. Застосовані методики успішно використовуються при виконанні кандидатських дисертацій, дипломних і курсових робіт, а також при проведенні практичних занять на кафедрі біохімії Чернівецького університету.

Осненні положення, що виносяться на захист: 1) молекулярна еволюція пов'язана з каріотипічною; зміни хромосомного апарату призводять до прискорення перебудов геному на різних ДНК, а саме - до інтенсифікації ампліфікацій-делецій послідовностей, що повторюються; 2) Молекулярно-біохімічна еволюція є не випадковою; вона підкоряється певним закономірностям, що впливають з особливостей організації геному рослин. Ці особливості організації геному слід розглядати як важливий внутрішній еволюційний фактор.

Апробація роботи. Основні результати дисертації були представлені на XX конгресі FEBS (Будапешт, 1990); VI Європейському конгресі по біотехнології (Флоренція, 1993); Конгресі австрійських біохімічного і генетичного товариств (Відень, 1993); робочій нараді "Сучасні перспективи молекулярної біології рослин" (Гагтерслебен, 1994); Всесоюзних і Українських з'їздах біохімічного (Москва, 1986; Київ, 1992) і генетичного (Москва, 1987; Полтава, 1992) товариств; міжнародних, всесоюзних і українських конференціях, симпозіумах і наукових школах (Москва, 1987, 1990; Київ, 1994; Санкт-Петербург, 1992; Мінськ, 1986, 1990; Тбілісі, 1987; Харків, 1987; Чернівці, 1983, 1991, 1993, 1994; Дніпропетровськ, 1987; Уфа, 1987, 1989, 1991; Чебоксари, 1990; Саратов, 1994; Ужгород, 1989; Пушкіно-на-Оке, 1991; Канів, 1984).

Публікації. Основні результати дисертації викладені в 22 журнальних статтях і 44 тезах конференцій.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, методичної частини, результатів і їх обговорення, заключення, висновків, списку літератури (457 джерел) та додатку. Робота викладена на 299 сторінках, містить 21 таблицю та 46 малюнків.

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ДОСЛІДЖЕНЬ

Поліплоїдія в природі, як правило, пов'язана з міжвидовою гібридизацією (Грант, 1981), що перешкоджає вивченню її в "чистому" вигляді. Зручною моделлю для оцінки ефектів, пов'язаних тільки з поліплоїдією, виявились гаплоїдні (Гп-1, Гп-63, Гп-76) та похідні від них автодиплоїдні (ГПЛ-1, (Д-1), ГПЛ-63, (Д-63), ГПЛ-76 (Д-76)), високогомозиготні форми кукурудзи. Для оцінки впливу гетерозиготності на досліджувані параметри були також досліджені гібриди (Гб-1, Гб-63, Гб-76), отримані в результаті запилення автодиплоїдів гаплоіндуктивним маркером ЗМС і районова-

ний гетерозисний гібрид Буковинський 11ТВ. Гаплоїди виявляли методом генетичного маркування в сухих зернівках [Тирнов, 1984].

Для вивчення можливого взаємозв'язку між хромосомною і молекулярною еволюцією об'єкти досліджень повинні задовільняти ряд вимог. (1) У досліджуваних групах повинна бути поширена алоплоїдія, причому по можливості повинні бути відомі потенційні батьки природних гібридів; (2) В одній з порівнюваних груп повинна бути присутня анеуплоїдія (бажано у формі ряду з декількох хромосомних чисел), тоді як в другій групі анеуплоїдні форми повинні бути відсутніми. Групами, що задовільняють цим вимогам виявились роди *Nicotiana* і *Prunus*; перший з них є прикладом групи з активною хромосомною еволюцією, тоді як у другого хромосоми не зазнавали істотних перебудов [Федоров, 1969]. Було досліджено наступні види: *N.tomentosiformis* Goodsp., *N.tophora* Griseb., *N.tabacum* L., *N.alata* Link et Otto, *N.langsdorffii* Weinm., *N.longiflora* Cav., *N.plumbaginifolia* Viv., *N.sanderae* hort., *N.sylvestris* Speg. et Comes, *N.glauca* Grah., *N.knigtiana* Goodsp., *N.paniculata* L., *N.solanifolia* Walp., гібрид *N.tabacum* x *N.glauca*, *Petunia hybrida*, *Solanum tuberosum* L., *S.nigrum* L., *Datura innoxia* Mill., *D.stramonium* L., *Lycium halimifolium* Mill., *Prunus armeniaca* L. (сорт Краснощокій і несортова форма Мердель), *P.avium* L. (сорт Бігарро Франц Йосиф і дика форма), *P.fruticosa* Pall., *P.tomentosa* Thunb., *P.cerasus* L. (сорта Гріот Остреймський і Шпанка краснокутська), *P.laurocerasus* L., *P.padus* L., *P.grayana* Maxim., *P.persica* L. (сорт Пам'яті Шевченка), *P.cerasifera* Ehrh. (дві здичавілі несортові форми), *P.domestica* L. (сорта Угорка звичайна, Анна Шпет і Ренклюд жовтий) і *P.spinosa* L., *Malus domestica* (сорт Джонатан).

Оскільки при автоплідії структурних перебудов в геномі не відбувається, то для вивчення наслідків цього явища вмішено було звернутися до оцінки змін у функціонуванні геному. Зокрема, досліджувалися процеси синтезу РНК і білків. Що ж стосується алоплоїдії і анеуплоїдії, то в цьому випадку ми, навпаки, зосередили свою увагу на дослідженні перетворень в геномі на структурному рівні.

Вивчення інтенсивності синтезу білка оцінювали за включенням міченого 14-С-лейцину. Цитозольні білки виділяли з другого листка паростків за описаним методом [Доцанов і др., 1981] з незначними модифікаціями [Скоупс, 1985].

Для вивчення поліморфізму цитозольних білків, останні

розділяли на 3 фракції шляхом висолування сульфатом амонію, з наступним розділенням кожної фракції іонообмінною хроматографією на мікроколони з аніонообмінником "Servacell-DEAE 32" (Остерман, 1985). Білки кожної підфракції розділяли методом SDS-диск-електрофореза ПААГі (Laemmli, 1970).

Поліморфізм амінотрансферази, пероксидази, супероксиддисмутази та неспецифічної естерази вивчали методом диск-електрофорезу в ПААГі з подальшою ідентифікацією ізоферментних форм за загальновідомими методами (Мауер 1972, Гааль и др., 1982).

Інтенсивність синтезу РНК в паростках кукурудзи оцінювали по включенню 3-Н-уридину з подальшим виділенням РНК і визначенням питомої радіоактивності. Виділення рРНК, тРНК та мРНК проводили згідно з методами, описаними в літературі (Das et al., 1990; Булко, 1986; Бориски и др., 1989).

Підрахунок радіоактивності проводили на сцинтиляційному лічильнику "БЕТА-1". Математична обробка експериментальних даних виконувалась за методом варіаційної статистики (Маслов, 1978).

Для вивчення дивергенції ПП виділяли ядерну ДНК. (Нактинис и др., 1977; Мирониченко и др., 1988). Для її очистки використовували хроматографію на колонках з сефарозом і на гідроксиапатиті (ГАП) (Britten, Davidson, 1971; Lurquin et al. 1975).

ДНК фрагментували за допомогою ультразвукового дезінтегратора (Britten et al., 1974; Петров, 1980). Розмір фрагментів визначали методом електрофорезу у агарозному гелі. 3-Н-мічену ДНК отримували методом "нік"-трансляції (Маниатис и др., 1984).

Реасоціацію та молекулярну гібридизацію ДНК проводили при стандартному температурному критерії за описаними методиками. Для розділення одно- та двонитчатої ДНК використовували хроматографію на ГАП (Britten et al., 1974; Петров, 1980).

На основі отриманих результатів будували дендрограми, що відображали подібність між вивченими видами. Для цього використовували пакет програм "PHYLIP" (версія 3.2).

Для картування рДНК використовували рестриктази Eco RI, Eco RV, Bam HI, Xba I, Hind III, Dra I. Розщеплення ДНК рестриктазами, розділення продуктів гідролізу електрофорезом в агарозному гелі, перенесення фрагментів ДНК на капронові фільтри та їх гібридизацію з міченими зондами проводили за описаними методами (Маниатис и др., 1984, Девис и др., 1984).

В якості молекулярних зондів використовувалися 18S-рРНК або 25S-рРНК кукурудзи або ж клоновані Eco RI-фрагменти генів рРНК

Arabidopsis thaliana [Gruendler et al., 1991]. Для виділення рекомбінантних плазмід використовували метод лужного лізису [Маниатис и др., 1984].

Клонування послідовностей ВМС рДНК *Nicotiana* проводили в полілінкері плазміді Bluescript SK(+) по сайтах Eco RI і Xba I. В експериментах використовували лінію клітин *E.coli* Sure. Трансформацію *E.coli* проводили з використанням хлористого кальцію [Маниатис и др., 1984]. Скринінг колоній трансформантів здійснювали методом гібридизації на чашках [Маниатис и др., 1984]. В якості зонду використовували мічену 32-P клоновану 3'-кінцеву ділянку рДНК *A.thaliana* [Gruendler et al., 1991]. З відібраних колоній виділяли рекомбінантні плазміді і визначали в них розташування сайтів впізнавання рестриктаз, використаних раніше при рестриктному картуванні. Для остаточної ідентифікації клонів, що містять ВМС, проводили сіквенування кінцевих ділянок вставки.

Сіквенування проводили дідеокси-методом з ДНК-полімеразою T7, використовуючи набір фірми Pharmacia-LKB. Продукти реакції розділяли електрофорезом в денатуруючих умовах в ПААГ [Маниатис и др., 1984]. Одержану інформацію аналізували за допомогою комп'ютерних програм DNASIS і PC-Fold.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

СИНТЕЗ РНК ТА БІЛКІВ У РОСЛИН РІЗНОГО РІВНЯ ПЛОІДНОСТІ

Аналіз літератури показав, що відмінності за морфо-фізіологічними особливостями рослин різного рівня плоїдності можуть бути пояснені як наслідок зміни розмірів ядра клітини та співвідношення площі його поверхні до об'єму. Але відносно особливостей метаболізму такого ж висновку однозначно зрозуміти неможливо. Зокрема, в літературі нами не було знайдено даних щодо порівняльного вивчення синтезу РНК або білків у рослин різного рівня плоїдності.

Порівняння автодиплоїдних та гібридних форм з гаплоїдними показало значну перевагу останніх по інтенсивності синтезу всіх фракцій РНК (табл. 1): рівень включення 3-Н-уридину у гаплоїдних форм був в 1,5-2,6 рази вищим, ніж у диплоїдних. В той же час у диплоїдних форм інтенсивність синтезу РНК знаходиться приблизно на однаковому рівні незалежно від ступеня гетерозиготності.

Також встановлено (табл. 2), що у гаплоїдних форм рівень

Таблиця 1.

Включення 3-Н-уридина (імп/хв/мкг РНК) у РНК паростків кукурудзи різного рівня плідності

форми кукурудзи	яРНК	рРНК	тРНК
Гп-76	3062+350	362+41	300+23
Д-76	1800+175	153+16	141+13
Г6-76	1546+155	192+17	204+26
Гп-1	2944+201	348+29	284+27
Д-1	1472+125	195+17	163+15
Г6-1	1178+120	147+12	113+9
Буковинський 111В	1472+121	139+11	125+10

Таблиця 2

Інтенсивність включення 14-С-лейцина в білки паростків кукурудзи різного рівня плідності (М±м, n=4)

форми кукурудзи	Імп/хв на мкг білка
Гп-1	466 + 11
Д-1	405 + 10
Г6-1	344 + 25
Гп-76	411 + 15
Д-76	357 + 11
Г6-76	368 + 13
Гп-63	420 + 16
Д-63	350 + 11
Г6-63	339 + 18
Буковинський 111В	376 + 37

Примітка: В табл. 1 та 2 наведені середні значення для 5 - 7 незалежних дослідів. Різниця між гаплоїдами та диплоїдами достовірна (P < 0,05).

включення 14-С-лейцину у цитозольні білки на 15-20 % вищий, ніж у диплоїдних. Можливою причиною, що впливає на рівень включення 14-С-лейцину, могла би бути різниця у амінокислотному складі білків. Але раніше було встановлено [Жебрак и др., 1976], що у досліджених нами формах кукурудзи відмінності у вмісті окремих амінокислот (зокрема - лейцину) є незначними.

Іншою причиною, що могла би впливати на інтенсивність включення 14-С-лейцину є різниця у вмісті окремих білкових фракцій цитозолю у рослин з різною плоідністю. Тому на наступному етапі роботи було проведено вивчення поліморфізму цитозольних білків у форм кукурудзи різного рівня плоідності. Одержані денситограми електрофоретичного розділення цитозольних білків листків показали, що автодиплоїди мають здебільшого такий самий набір білків, що і гаплоїди, хоча в ряді випадків при зміні рівня плоідності була виявлена різниця в інтенсивності забарвлення в білкових спектрах і навіть поява (або зникнення) окремих смуг.

Крім того було проведено вивчення поліморфізму деяких ферментів, а саме - амінотрансферази, супероксиддисмутази, пероксидази і неспецифічної естерази. В більшості випадків ізоферментні спектри гаплоїдів та відповідних автодиплоїдів були ідентичні: лише для пари Г-76 - Д-76 було знайдено незначну різницю у наборі ізоформ естерази.

Отже, відмінності в амінокислотному чи фракційному складі не можуть істотно впливати на інтенсивність включення міченого попередника в цитозольні білки у форм кукурудзи різного рівня плоідності. Таким чином, збільшення рівня плоідності веде до зниження інтенсивності синтезу РНК та цитозольних білків. Причому ступінь гетерозиготності суттєвого впливу на ці процеси у досліджуваних нами форм кукурудзи не виявляє.

В літературі існує думка [Cavalier-Smith, 1982; McKey, 1987], що відмінності в метаболізмі рослин при переході на інший рівень плоідності обумовлені зміною швидкостей транспорту та дифузії речовин, які пов'язані зі змінами розмірів і співвідношення поверхні та об'ємів клітин (ядер). Основну роль тут повинен грати транспорт високомолекулярних сполук - іРНК або регуляторних білків. Отримані нами результати узгоджуються з такими уявленнями і свідчать, що відмінності в інтенсивностях синтезу РНК і білків визначаються самим фактом зміни рівня плоідності.

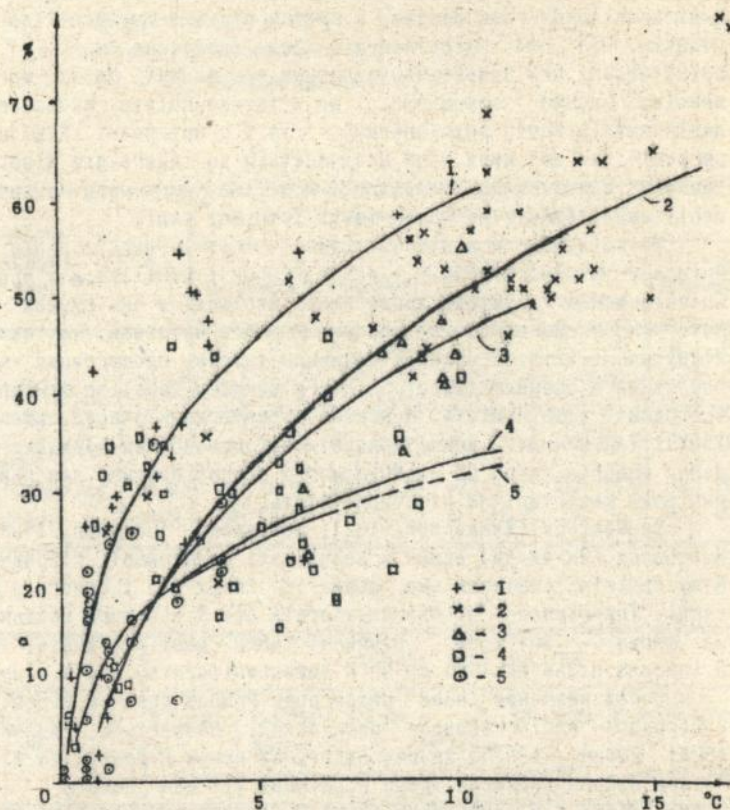
ЕВОЛЮЦІЯ КАРІОТИПУ І ДИВЕРГЕНЦІЯ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ, ЩО ПОВТОРЮЮТЬСЯ

В природі [Грант, 1980], як правило, зустрічаються алоплоїдні форми, що містять в одному ядрі предкові геноми різних батьківських видів. Тому на наступному етапі досліджень було вивчено особливості організації ПП в зв'язку з алоплоїдією та іншими формами хромосомної еволюції, зокрема - в зв'язку з анеуплоїдією. Для вирішення цього завдання був використаний метод молекулярної гібридизації. Визначались два параметри: (а) рівень гібридизації; та (б) температура плавлення гібридних дуплексів.

Аналіз отриманих результатів та співставлення їх з літературними даними для інших груп покритонасінних рослин [Кашеваров и др., 1982; Flavell et al., 1980] дозволяє стверджувати, що для роду *Nicotiana* характерна висока швидкість мінливості наборів ПП - мінімальна подібність в межах роду становить лише 45-50%. Найвища швидкість оновлення наборів ПП виявлена для видів секції *Alatae* роду *Nicotiana*, видоутворення яких було пов'язане з анеуплоїдією. Мало місце не тільки зникнення ряду "старих" родин ПП, але і поява "нових". Таким чином, анеуплоїдія мала істотне значення для молекулярної еволюції у *Nicotiana*.

Дослідження подібності ПП для видів роду *Prunus* показало, що в більшості реакцій між ДНК представників різних підродів кількість гомологічних ПП була 60-80%, а негібридних видів одного підроду (*Cerasus*, *Prunus* та *Padus*) - 80-95%. Таким чином, рід *Prunus* є групою, що має відносно мало мінливі ПП.

На величину рівня гібридизації ДНК перш за все впливають делеції і ампліфікації послідовностей, тоді як термостабільність гібридних дуплексів відображає накопиченням нуклеотидних замін (точкових мутацій) в процесі молекулярної дивергенції видів. Співставляючи взаємозв'язок між цими двома параметрами, можна судити про характер еволюції ПП в різних групах рослин. Для цього ми побудували відповідні криві регресії (мал. 1). Найбільш достовірно взаємозв'язок між рівнем гомології і термостабільністю гібридних дуплексів відображала логарифмічна залежність: $y = A + B \lg(x) + C \lg(x)$, де x - $\Delta T_{пл}$, а y - рівень гомології. Привертає увагу, що крива для роду *Nicotiana* проходить помітно вище такої для роду *Prunus*. Іншими словами, при однаковому рівні накопичення нуклеотидних замін рід *Nicotiana* має менший ступінь міжвидової гомології ПП порівняно з родом *Prunus*. Це означає, що в еволюції ПП в роді *Nicotiana* елімінація і



Мал. 1. Криві регресії, що відображають взаємозв'язок між $\Delta T_{пл}$. (відкладено по осі ОХ) та рівнем відносної гібридизованості (відкладено по осі ОУ) у дослідях по молекулярній гібридизації; 1 - рід *Nicotiana*, 2 - родина *Ariaceae* [Вальєхо-Роман и др., 1979; Антонов, 1988], 3 - рід *Iris* [Беридзе, 1986], 4 - рід *Prunus*, 5 - рід *Achillea* [Кашеваров, Антонов, 1982].

ампліфікація займали значне місце, тоді як геноми видів роду *Prunus* переважно не зазнали різких делецій-ампліфікацій ПП.

Виходячи з даних, що є у літературі (Беридзе, 1986; Antonov et al., 1987), нами були також побудовані криві регресії для декількох інших груп рослин, а саме - родів *Iris*, *Achillea* та їх родичів, та для представників род. *Apiaceae* (мал. 1). При співставленні цих кривих з отриманими на основі наших експериментів, можна зазначити, що інтенсивність процесів делецій-ампліфікацій була висока у *Iris* і у *Apiaceae*. Хід кривих регресії для цих двох груп наближається до такого для *Nicotiana*. Навпаки, в молекулярній еволюції *Achillea*, як у роду *Prunus*, делеції-ампліфікації не грали такої істотної ролі.

Що спільного у родів *Nicotiana*, *Iris* і представників род. *Apiaceae* з одного боку, і родів *Prunus* і *Achillea*, з другого? Співставлення характеру хромосомної еволюції в цих групах показує, що в багатьох з вивчених родів *Apiaceae*, а також - у *Nicotiana* і *Iris* є велика різноманітність хромосомних чисел, пов'язана з анеуплоїдією. З іншого боку, у *Achillea* і *Prunus* ми знаходимо стабільність основних хромосомних чисел (Федоров, 1969). Таким чином, можна припустити, що найбільш відчутно оновлення наборів родин ПП відбувалися в групах рослин, для яких характерна каріотипічна різноманітність.

Вважається [Жуковский, 1971; Goodspeed, Thompson, 1959], що *N. tabacum* ($2n=4x=48$) виник в результаті спонтанної гібридизації *N. sylvestris* (материнська форма - $2n=2x=24$) і одного з видів секції *Tomentosae* - *N. tomentosiformis* або *N. otophora* (батьківська форма - $2n=2x=24$). Отримані нами дані свідчать, що ПП *N. tabacum* більш подібні до ПП *N. tomentosiformis*, ніж *N. otophora*.

Серед вивчених нами видів роду *Prunus* два - *P. domestica* і *P. cerasus* - мають гібридне походження. Вважається [Жуковский, 1971; Рыбин, 1967], що гексаплоїдний геном *P. domestica* містить чотири набори хромосом терну *P. spinosa* і два набори - аличі *P. cerasifera*, а культурна вишня *P. cerasus* виникла в результаті об'єднання двох геномів *P. avium* і двох - *P. fruticosa*. Результати молекулярної гібридизації ПП підтверджують ці гіпотези.

В експериментах з використанням в якості реперу мічечких ДНК батьківських видів було виявлено, що *N. tabacum* успадковує не весь генетичний матеріал батьків: елімінується близько 1% ПП кожного з вихідних диплоїдів (табл. 3). Аналогічна картина спостерігається і для роду *Prunus*: в геномах алоплоїдів можуть бути

Таблиця 3.

Гібридизація ПП ДНК представників різних секцій (I)
та представників секції *Alatae* (II) роду *Nicotiana*.

A - термостабільність (°C) фрагментів нативної ДНК,
використаної для мічення;

Б - відносна гібридизованість (%);

В - Т пл. (°C) гібридних дуплексів ПП ДНК.

(I)

Джерело міченої ДНК	A	Джерело неміченої ДНК									
		<i>N. tabacum</i>		<i>N. otophora</i>		<i>N. tomentosiformis</i>		<i>N. sylvestris</i>		<i>N. glauca</i>	
		Б	В	Б	В	Б	В	Б	В	Б	В
<i>N. tabacum</i>	86,3	100	74,7	76	72,6	82	73,4	91	74,1	--	--
<i>N. otophora</i>	87,0	85	73,5	100	74,3	95	74,3	63	71,9	45	71,3
<i>N. tomentosiformis</i>	87,1	89	74,4	93	74,4	100	75,4	63	72,4	55	71,7
<i>N. sylvestris</i>	88,2	90	74,9	49	71,8	49	71,7	100	75,0	66	72,3
<i>N. glauca</i>	88,5	82	74,7	39	71,7	41	72,0	77	74,4	100	80,5

(II)

Джерело міченої ДНК	A	Джерело неміченої ДНК													
		<i>N. longiflora</i>		<i>N. plumbaginifolia</i>		<i>N. sanderae</i>		<i>N. alata</i>		<i>N. langsdorffii</i>		<i>N. sylvestris</i>		<i>Petunia hybrida</i>	
		Б	В	Б	В	Б	В	Б	В	Б	В	Б	В	Б	В
<i>N. longiflora</i>	87,7	100	76,6	93	75,5	70	74,9	--	--	70	75,2	48	71,6	--	--
<i>N. plumbaginifolia</i>	88,0	--	--	100	79,6	94	79,5	73	79,0	71	78,3	52	75,9	9	70,7
<i>N. alata</i>	87,9	--	--	100	78,9	102	79,3	100	79,9	97	79,0	75	76,8	--	--
<i>N. langsdorffii</i>	88,0	--	--	89	79,0	94	79,1	73	78,0	100	79,2	68	76,8	--	--
<i>N. sylvestris</i>	88,1	57	73,7	57	73,9	70	74,3	70	74,1	94	74,4	100	74,8	9	72,0

Таблиця 4

Гібридизація ПП ДНК представників різних подродів (I) та представників подродів *Cerasus* та *Padus* (II) роду *Prunus*

A - термостабільність (°C) фрагментів нативної ДНК, використаної для мічення;

Б - відносна гібридизованість (%);

В - Т пл. (°C) гібридних дуплексів ПП ДНК.

(I)

Джерело міченої ДНК	A	Джерело неміченої ДНК															
		P. armeniaca		P. avium (Франц Йосип)		P. lauro-cerasus		P. padus		P. persica		P. spinosa		M. domestica			
		Б	В	Б	В	Б	В	Б	В	Б	В	Б	В	Б	В		
P. armeniaca	86,2	100	84,0	80	79,9	65	81,6	79	81,8	--	--	55	81,4	--	--		
P. avium	86,4	73	73,1	100	80,4	71	71,4	81	73,6	58	70,4	78	72,0	25	68,5		
P. lauro-cerasus	86,5	64	79,8	67	79,6	100	81,7	65	80,5	73	80,9	68	80,7	33	80,0		
P. padus	85,1	83	76,8	80	77,3	70	75,2	100	80,5	54	73,8	70	76,3	30	77,0		
P. persica	87,9	74	80,3	78	78,8	64	79,5	75	79,1	100	85,1	67	79,8	30	82,1		
P. spinosa	85,4	56	80,6	77	78,7	64	75,9	60	77,7	68	78,6	100	84,4	34	81,0		

(II)

Джерело міченої ДНК	A	Джерело неміченої ДНК															
		P. avium (Франц Йосип)		P. avium (ліва форма)		P. cerasus		P. fruticosa		P. tomentosa		P. padus		P. grajana			
		Б	В	Б	В	Б	В	Б	В	Б	В	Б	В	Б	В		
P. avium	86,4	100	80,4	93	80,3	95	80,2	88	79,2	84	75,0	81	73,8	--	--		
P. cerasus	88,1	99	82,6	96	81,4	100	83,3	91	82,3	78	80,1	--	--	--	--		
P. fruticosa	84,1	96	74,7	93	74,9	99	75,2	100	75,1	70	72,5	68	70,7	--	--		
P. padus	85,1	80	77,9	75	77,2	--	--	74	78,1	69	78,9	100	80,5	93	80,2		

відсутні до 8% ПП батьківських форм (табл. 4).

Можна висловити припущення, що часткова елімінація послідовностей ДНК батьківських видів необхідна для успішного формування алополіплоїдного гібриду, оскільки приводить до збільшення подібності вихідних геномів. На нашу думку, це може бути необхідно для узгодженої роботи батьківських геномів в межах одного клітинного ядра. В такому випадку подібність ДНК вихідних видів може бути одним з факторів, що полегшують формування гібридів.

В природі гібридизація відбувається як на диплоїдному рівні, так і з переходом на більш високий рівень плоїдності. Відомо що, у тютюнів для близьких видів можна отримувати плідні гібриди на диплоїдному рівні [Понерт, 1979; Грант, 1984]. Згідно з нашими даними, такі види мають в геномах 75-100% гомологічних ПП. У *Prunus* також порівняно легко вдаються схрещування між близькими видами [Жуковский, 1971]. За нашими даними, така ситуація спостерігається для форм, що мають рівень гомології ПП приблизно 80-100%. При більших дистанціях - 60-80% гомології - отримати в результаті схрещування нормальні рослини важко. Складається враження, що при рівні гомології нижчому, ніж 75-80% схрещування на диплоїдному рівні навряд чи можливе. Гібриди, як правило, нежиттєздатні, стерильність пилку висока, насіння має низьку схожість [Жуковский, 1971]. В цьому випадку успіх може бути досягнутий при підвищенні рівня плоїдності і формуванні алоплоїдної форми, як це мало місце в природі стосовно *N. tabacum*, *P. domestica* і *P. cerasus*.

Яка мінімальна подібність геномів батьківських форм необхідна для отримання алополіплоїдного гібриду? Найменша подібність, відома на сьогодні, встановлена нами для "батьків" культурного тютюну - 50-60% гомологічних послідовностей. Згідно нашим даним, рівень гомології ПП у томату *L. esculentum* і картоплі *S. tuberosum* складає близько 40%. В той же час вважається, що отримання гібридів між представниками цих двох родів цілком можливе [O'Connell, Hanson, 1986].

ОРГАНІЗАЦІЯ І ПОЛІМОРФІЗМ рДНК РОСЛИН

Наведені вище експерименти проводились на всій фракції ПП. Але для того, щоб зрозуміти молекулярні механізми, що лежать в основі перебудов геному, необхідно дослідити еволюції окремих

його ділянок. Зокрема постає питання: чи буде взаємозв'язок між каріотипічною та молекулярною еволюцією, виявлений нами для основної маси ПП, спостерігатись і для ПП, що виконують добре відомі функції і знаходяться під контролем добору?

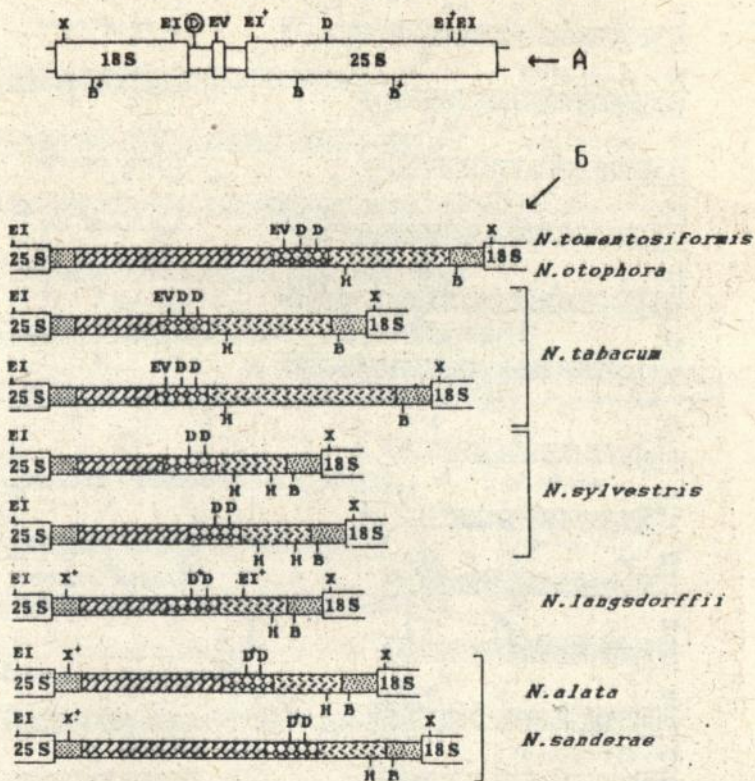
Для прояснення цього питання було досліджено організацію рДНК в родах *Nicotiana* та *Prunus*, оскільки рДНК є зручною моделлю для вивчення молекулярної еволюції та таксономії рослин (Rogers, Bendich, 1987; Wilcox et al., 1992). Особлива роль рДНК при віддаленій гібридизації була продемонстрована ще М.Навашиним (Navashin, 1927), який відкрив явище ядерцевого домінування.

Першим етапом у вивченні рДНК було рестриктивне картування (мал. 2). Встановлено, що у досліджених нами видів локалізація в генах 18 S та 26 S рРНК більшості сайтів впізнавання використаних нами рестриктаз співпадає з такою для більшості покритонасінних (Колоша, 1981; Yakura et al., 1984; Capesius, 1991; Borisjuk, Nemleben, 1992). В той же час у пасльонових є і специфічні сайти Eco RI на 5'- та на 3'-кінцях гену 25 S рРНК, а у *Prunus* - сайт Bam HI у гені 18 S рРНК в позиції 1,4 тпн. Що стосується гену 5,8 S та малих міжгенних спейсерів, то тут в деяких випадках знайдена різниця навіть для близьких родів та видів, що проявляється в наявності чи відсутності сайтів Dra I та Eco RI.

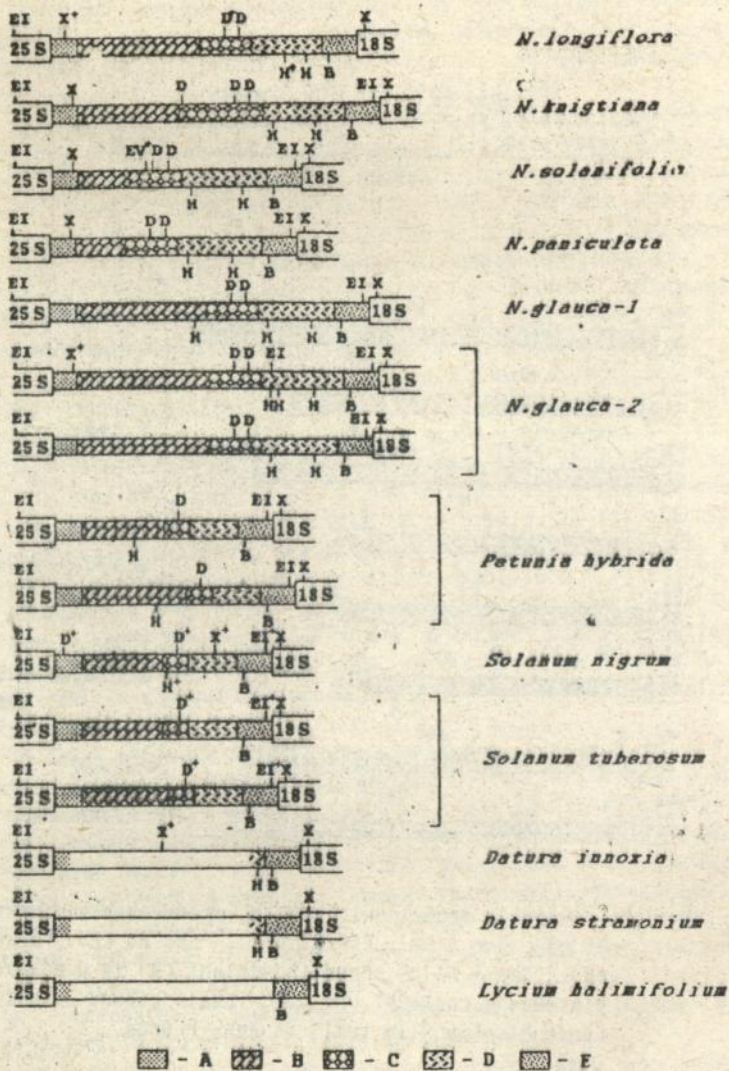
Порівняння між собою отриманих рестриктивних карт дозволяє виділити в межах великого міжгенного спейсера (ВМС) *Nicotiana* щонайменше п'ять основних областей - А, В, С, D та Е (мал. 2а). Різниця ВМС по довжині пов'язана переважно зі зміною розмірів областей В та D.

В інших вивчених нами представників род. Пасльонових в загальних рисах спостерігається подібність з *Nicotiana* в організації ВМС. Так, область Е присутня і має ідентичні розміри у ВМС всіх вивчених пасльонових. Що стосується інших областей ВМС, то найбільшу подібність з *Nicotiana* демонструє філогенетично близький вид *Petunia hybrida*. Дальше йдуть представники другої підроддини - *Solanoidea* (Hunziker, 1979): *Solanum tuberosum* та *S. nigrum*. Найменша подібність виявляється з рДНК філогенетично далекого *Lycium halimifolium*. Проте, на основі результатів рестриктивного картування можна висунути гіпотезу про універсальність організації ВМС в рДНК пасльонових.

Співставлення рестриктивних карт для різних видів роду *Prunus* дозволяє умовно виділити в межах ВМС щонайменше чотири області - А, В, С та D (мал. 2б). Зміни довжини повторів рДНК пов'язані, в



Мал. 2 (початок). Локалізація сайтів впізнання рестриктаз Bam HI (B), Dra I (D), Eco RI (EI), Eco RV (EV), Hind III (H), Xba I (X) в кодувчій частині (А) та у великому міжгенному спейсері (Б) різних видів родини Solanaceae (роди Nicotiana та інші) та роду Prunus.



Мал. 2 (продовження).



основним, зі змінами областей В та С.

Особливо слід сказати про "короткі" варіанти рДНК у *P. persica* і у *P. cerasifera*. Їх особливістю є суттєва різниця (2,1-2,2 тпн) в розмірах ВМС між довгим і коротким варіантом рДНК при відсутності повторів проміжної довжини та відсутність у ВМС коротких повторів сайтів впізнавання для всіх шести використаних рестриктаз. Можна припустити, що ці повтори з'явилися не в результаті серії послідовних делецій відносно невеликих субповторів, а як наслідок різкої втрати значної частини ВМС, в тому числі - ділянок, що несуть сайти впізнавання рестриктаз. Але однією тільки делецією більшої частини ВМС пояснити зникнення всіх сайтів неможливо, оскільки в цьому випадку короткі варіанти повинні були б мати ще менші розміри. Можливо, мало місце повне метилювання сайтів, що залишилися в ВМС після делеції.

Одержані нами дані свідчать про помітну мінливість за довжиною повторів рДНК у досліджених родах. Які фактори визначають мінливість рДНК і чи пов'язана ця мінливість з еволюцією на інших рівнях організації, зокрема - з хромосомною еволюцією?

Аналізуючи причини, що визначають характер мінливості довжини молекули гістона H1 в макроеволюційному аспекті, Бердников [Бердников, 1992] формулює такі положення. При нейтралістському характері молекулярної еволюції повинна спостерігатися кореляція між рівнем мінливості (дисперсією) по довжині білка і геологічним віком таксономічної групи. При адаптивному характері молекулярної еволюції повинна спостерігатися кореляція між мінливістю білка та інтенсивністю видоутворення в таксономічній групі. Про цю інтенсивність автор пропонує судити по кількості видів, що входять в досліджуваний таксон.

Наявні уявлення про структуру і функції ВМС дозволяють застосувати згадану вище концепцію так званого мобілізуючого добору до молекулярної еволюції рДНК. Для цього ми розраховували дисперсію (D) по довжині повтору рДНК в декількох групах рослин (табл. 5). Для розрахунку були використані як отримані нами дані (*Prunus*, *Nicotiana*, *Juglans-Carya*, частково - *Solanum*), так і наявні в літературі (*Solanum* [Borisjuk et al., 1994], *Beta* [Santoni, Berville, 1992], *Aegilops-Triticum* [Вахитов, 1989]).

Більша частина даних, що є по рДНК роду *Solanum*, відноситься до видів секції *Tuberarium*. Тому розрахунки проводилися двічі - як для всього роду (варіант А), так і окремо для вказаної секції (варіант Б) - табл. 5. В результаті було встановлено, що

Таблиця 5.

Таксон	Середня довжина повтору рДНК, тпн	Дис-персія D	Асиметрія As	Експес Ек	Вік (млн. років) t	D/tx10	Кількість видів у сучасній флорі
Juglans-Carya	11.3	1.040	-0.554	1.693	100	10.40	40
Prunus	11.14 (10.85)	0.774 (1.322)	0.193 (-0.338)	1.041 (3.872)	95	8.15 (13.92)	400
Solanum	8.96	0.266	0.068	0.099	95	2.80	1700
Solanum (секція tuberosum)	8.96	0.273	0.072	0.096	75	3.64	80-200
Nicotiana (американські види)	10.35	0.658	0.188	0.523	80	8.23	45
Aegilops-Triticum	6.75	0.442	-0.085	0.749	70	6.31	30-40
Beta	10.89	0.216	-0.014	0.008	65	3.32	15

Примітка: Для розрахунків параметрів для *Nicotiana* та *Prunus* були використані оригінальні дані, наведені в цій роботі; для *Juglans-Carya* - наші неопубліковані результати; для *Solanum* - наші дані та результати Borisjuk et al. [1992], *Aegilops-Triticum* - дані Вахитова [1989], *Beta* - дані Santoni, Berville [1992]. Для роду *Prunus* без дужок наведені параметри, отримані без врахування "коротких" повторів у *P.cerasifera* і *P.persica*, в дужках - з врахуванням цих повторів (див. пояснення у тексті). Вік таксонів оцінювали, виходячи з відомостей, що містяться в літературі [Шуковський, 1971; Мейен, 1987].

взаємозв'язок між рівнем мінливості рДНК за довжиною (D) і геологічним віком таксону може бути описаний рівнянням лінійної регресії. При цьому у варіанті А коефіцієнт кореляції був істотно нижчий ($r=0,644$), ніж у варіанті Б ($r=0,843$). Значення коефіцієнтів регресії та кореляції були достовірними в усіх випадках. Різниця між варіантами А і Б пояснюється малою мінливістю довжини рДНК у роді *Solanum*: якщо варіабельність рДНК в секції *Tuberosium* можна вважати просто низькою, то для всього роду *Solanum* її слід розглядати як аномально низьку.

Із припущення про адаптивний характер еволюції рДНК випливає (Бердников, 1992), що між мінливістю рДНК за одиницю часу (D/t) та кількістю видів, що входять до таксону, має спостерігатися позитивна кореляція. Але проведені нами розрахунки показали, що кореляція між кількістю видів в групі та мінливістю рДНК відсутня. Іншими словами, аналіз характеру мінливості рДНК в різних групах рослин показав, що в макроеволюційних масштабах мінливість рДНК по довжині ВС не пов'язана з темпом видоутворення, тобто - вона не входить до числа основних факторів, що визначають пристосованість вивчених таксонів.

Досліджені нами роди рослин відрізняються по середній довжині повтору рДНК. Наприклад, у роді *Nicotiana* близька до відповідної у *Juglandaceae* (табл. 5). В то же час ця довжина становить 10,36 тпн, що значно більше, ніж середнє значення для роду *Solanum* - 8,96 тпн. Таким чином, *Nicotiana* відрізняється, по-перше, більшими розмірами повтору рДНК і, по-друге, розширеними межами варіювання цих розмірів. І те, і друге свідчить про підвищену швидкість молекулярної еволюції рДНК через ампліфікацію у *Nicotiana*. Різниця між *Nicotiana* і *Solanum* є особливо важливою та наочною, оскільки з усіх наведених в табл. 5 таксонів тільки ці два роди належать до однієї родини і, крім того, подібні за такими параметрами, як географічне походження, життєва форма (переважно - трав'янисті однолітки), характер поширення і еволюції, екологічна роль (Жуковский, 1971; Денисова, Васильченко, 1980). Однак між цими двома родами є істотна різниця в характері хромосомної еволюції - у *Nicotiana* широко представлена анеуплоїдія, тоді як у *Solanum* анеуплоїдні хромосомні числа - виняток. Напрошується висновок, що мінливість по довжині рДНК у пасльонових взаємозв'язана з мінливістю каріотипу.

При формуванні алополіплоїдного геному теоретично можливі три варіанти успадкування рДНК: 1) успадкування повторів, що ха-

рактерні для обох батьків; 2) успадкування повторів, що характерні для одного з батьків; 3) поява нових варіантів рДНК, які відсутні у батьківських видів.

Перша із вказаних можливостей реалізується для гібриду першого покоління від схрещування *N. tabacum* x *N. glauca* - набори фрагментів рДНК на радіоавтографах для цієї форми являють собою комбінацію відповідних фрагментів обох батьків.

Крім того, двобатьківське успадкування рДНК встановлено для *P. cerasus*: один з варіантів рДНК у *P. cerasus* є ідентичним з *P. avium*, тоді як другий успадкований від *P. fruticosa*. Отримані нами дані можна розглядати як молекулярно-генетичне підтвердження гіпотези про гібридне походження культурної вишні *P. cerasus*.

Однобатьківське успадкування рДНК було встановлено для *P. domestica* (Чорка звичайна), організація рДНК у якого ідентична з організацією рДНК *P. spinosa*.

Інша картина виявлена для *N. tabacum*. З аналізу результатів рестриктного картування випливає, що природний алотетраплоїд *N. tabacum* має організацію рДНК, що істотно відрізняється від аналогічної у батьківських видів *N. sylvestris* і *N. tomentosiformis*. На жаль, дані рестриктного картування не дозволяють детально прослідкувати молекулярну еволюцію рДНК *N. tabacum*. Для більш повного розуміння перебудов рДНК у гібридного виду необхідно клонування відповідних ділянок геному, про що піде мова нижче.

ОРГАНІЗАЦІЯ ВМС рДНК NICOTIANA.

Які фактори контролювали мінливість рДНК, яким чином відбувалися перебудови рДНК в роді *Nicotiana*? Як відбувалося становлення рДНК *N. tabacum*? Для того, щоб відповісти на ці питання було проведено розшифровування первинних нуклеотидних послідовностей (сіквенування) ВМС рДНК батьківських видів *N. sylvestris* і *N. tomentosiformis*.

Комп'ютерний аналіз отриманих послідовностей показав, що у ВМС досліджених видів *Nicotiana* можна виділити по 7 областей, що відрізняються певними структурними особливостями та мають різний нуклеотидний склад (мал. 3, 4). На границі IV та V областей була знайдена послідовність TATATAAGGGGG, яка ідентична з TIS у *Lycopersicon esculentum* [Perry, Palukaitis 1990].

Дві області - II та VI - складаються з субповторів і суттєво відрізняються у *N. tomentosiformis* та *N. sylvestris* за довжи-

N. tomentosiformis

1	aaaticaccra	atgttttwaat	tgttcaccca	ccaatagana	acgttawctg	50
51	atittakacc	gtcttgaasac	atgttagatt	taccctactg	atracacagt	100
101	cccaataata	atccaaccta	gtacraaana	aacconttat	tccacacatt	150
151	ttctatcncr	cttgrttinaa	aagcccaatna	cccaaaacta	cccttaccctg	200
201	ttattataact	aaacccctct	aaatcagaat	ccatcttana	accgacgat	250
251	kcaccacccc	tccrcttacc	aaccccaat	aaatcccttt	accocccaa	300
301	aacacatctc	cttgrctaa	tcatccrnc	naaaatccr	ccatccccc	350
351	cttkaatrac	aatttccatc	kaacccrnc	taraatcctt	tacacacac	400
401	ttaaataccr	aacnaaatat	ttaaatctc	aaatccrct	tcttccccc	450
451	atccactgar	atccarccct	tttccrctc	gattct		
				ccc	cccccccca	500
501	ttccaatcaa	tttataactc	ttttgaaaag	agttttatc	ctttcttgat	550
551	gctatatatt	atgccaaagt	ttggaaaatt	gaacaagtcc	tcaataccat	600
601	ggaacgat	ctatttctgt	atttaagtgt	aaatgtgact	tgctacttag	650
651	togttttgtg	gaaaaggctt	goccatgacg	ctaaaoccaa	tttaacttat	700
701	agaggitttt					
		cgaggtgttg	ttgtggatgc	caatgacaaa	gccaagatg	750
751	atgtgccaag	gcaagacgtc	ggaagctg			
			cg	ggacatggca	cgagctggga	800
801	ogtggocatt	gcaagcctgc	ggaagctgca	tgccacagdg	tggaagctgg	850
851	taggacatgg	ccatggcagc	acataggaca	tgatgggaca	tgccagcct	900
901	ggocatggca	catcatogga	ogtctattac	atggocattg	caagacctag	950
951	gacatgatgg	gacatagcca	ggctctctg	tacctgocag	gacatgacca	1000
1001	tgccaggaca	tgccaggagc	caggagctg	ccatggcagc	gtgtggagc	1050
1051	tgccaggaca	tgaccctgata	tgccaggcca	tggtctgacg	tgccatggc	1100
1101	ccgaogctgg	agctggcagg	atatggccac	ggcaggagcc	aggacatggc	1150
1151	aggcaggagc	caggacatgg	caggcctgg	ccatggcctg	ccgtctgaga	1200
1201	ttggcaggac	atggccatgg	caatggcagc	gacatggcag	gagccaggac	1250
1251	atggcatgac	catggcagca	ccaggacat	gacaggacat	ggccacggca	1300
1301	ggagccagga	catggcaggc	ogtggccatg	gctcggcctc	ggagctggct	1350
1351	ggacatggcc	atggccagcc	gtaggagctg	gcatggcacc	ggcatggcag	1400
1401	gtctcatggc	acggcctggc	acgtggcagg	acatggccat	ggcaggagcc	1450
1451	aggacatggc	aggagctggc	caagccagga	ccaggacat	ggcaggacac	1500
1501	aggacatggc	aggcctggc	catggcctgg	ccgtggagct	ggccatggct	1550
1551	cgccctggga	cgctggaagga	catggccatg	gcaagagcca	ggccctggcc	1600
1601	atggcagcc	atggcagctg	gtaggatagg	gcatggccac	gacccaggac	1650
1651	atgaogggac	atggcaggac	gcaggacatg	gcaggcctg	gctatggccc	1700
1701	gaagcaggac	gtgtggagc	tgccaggaca	tgcccatggc	aggaocagg	1750
1751	acatgacagg	acatggccac	ggcaggagcc	aggacatggc	ggcaggagcc	1800
1801	acatggcagg	gcttggccat	gctcggcctg	ccgaogctggc	catggcctgg	1850
1851	cgctggatgt	ggccatggct	ccgaogctgga	cgctggaagga	catggccatg	1900
1901	gcaagagcca	ggccctggcc	atggcagcc	atggagctc	tcatggcacc	1950
1951	gctggcaggc	tgccaggaca	tgcccatggc	aggagccagg	acatggcagg	2000
2001	agctggccac	ggcaggagcc	aggacatggc	aggagccagg	acatggcagg	2050
2051	gcttggccat	gctcggcctg	ccgaogctggc	catggcctgg	ccctgagagct	2100
2101	ggaaagacat	ggccatggca	ccagccaggc	catggcaggc	cgctggccatg	2150

2151	GCAOGGTGTC	GGAGGTGGTA	GGATATGGCC	ATGGCACAGC	GCAGGACATG	2200		
2201	ADGGGACATG	GCAGGAGCGA	GGACATGGCA	GGGGGTGGCC	ATGGCCCGAC	2250		
2251	GTOGGAGTGG	GCAGGACATG	GCCATGGCAC	AGGGCAGGAC	ATGACAGGAC	2300		
2301	ATGGCCATGG	CAGGACGCGA	GACATGGGAC	GGGGTGGCCA	TGGCTGGCCA	2350		
2351	TGGGAGGTGG	CCATGGCTGG	GGGTGGGAGG	TGSAAGGACA	TGGCCATGGC	2400		
2401	ADGACTCAGG	CTGGCCATGG	CAGGACATGG	GAGCTCTCAT	GGCACGGGCT	2450		
2451	CGGAGGTGGC	AGGACATGGC	CATGGCACGA	CGCAGGACAT	GACAGGACAT	2500		
2501	GGCCACGGCA	GGATGCAGGA	CATGGCAGGG	CGTGGGAGCT	GGCCATGGCT	2550		
2551	CGGGGTGGCA	CGTGGAAAGGA	CATGGCCATG	GCACGACCGA	GGGCATGGCA	2600		
2601	GGGGGTGGCC	ATGGCACGGT	GTOGGAGCTG	GTAGGATATG	GCCATGGCCAC	2650		
2651	GAGCGAGGAC	ATGACGGGAC	ATGGCAGGAT	GCAGGACATG	GCAGGGGGTG	2700		
2701	GCCATGGTCC	GAGCAGGAC	GTGGCAGGAC	ATGGCAGGAG	ATGGCCATGG	2750		
2751	CAGGAGCTAG	GACATGACAC	GAATGGCCAC	GGCAGGAGCC	AGCACATGGC	2800		
2801	AGGGCTTGGC	CATGGCTGGG	CGTGGGAGCT	GGCCATGGCT	CGGGTGGCTA	2850		
2851	CGTGGAAAGGA	CATGGCCATG	ACACGACGCA	GGCTGGCCAT	GGCACGACAT	2900		
2901	CGGAGCTCTC	ATGGCACGGC	GTOGGAGCTC	GCAGGACATG	ACCATGGCCAC	2950		
2951	GAGCGAGGAC	ATGACAGGAC	GTGGCCACGG	CAGGAGCGAG	GACATGGCCAG	3000		
3001	GAGCGAGGAC	ATGGCAGGAC	GTGGCCATGG	CTGGGGGTGG	GAGCTGGGAG	3050		
3051	GACATGGGCA	TGGTACGAGG	CAGGGCCATAG	CAGGGGTGGG	CCATGGCCAGG	3100		
3101	GTGTGGGAGG	TGGTAGGATA	TGGCCATGGC	ATGACGCGAG	ACATGACGGG	3150		
3151	ACATGGCAGG	AGCAGGACA	TGGCAGGGGG	TGGCTATGGC	CGACGACGGA	3200		
3201	CGTGTGGGCA	GTGGCAGGAC	ATGGCCATGG	CAGGACGCGA	GACATGACAG	3250		
3251	GACATGGGCA	CGGACGAGG	CAGGACATGG	CAGGAGCGAG	GACATGGCAC	3300		
3301	GCTGGCCATG	GCTGGGGTTC	GGAGGTGGCC	ATGGCTGGCC	ATGGGAGGTG	3350		
3351	GAAGGACATG	GCCATGGCAC	GAGCGAGGCG	GTGGCCATGG	CAGGCCATGG	3400		
3401	GAGCTCTCAT	GGCACGGGCT	CGGAGGTGGC	AGGACATGGA	CATGGCCACA	3450		
3451	ADGAGGACA	TGACAGGACA	TGGCCACGGC	AGGAGCGAGG	ACATGGCCAGG	3500		
3501	GGTGGCCAT	GGCACGAGCT	CGCACCGCT	CGCACCATAT	CTA	-		
				GTGC	AG	3550		
3551	CCAATGTTTA	ACAAGATGTC	AAGCACAAATG	ATGTTGGTGG	TGGTGGTGG	3600		
3601	TGGCTGGGGG	TGGTGGAAAA	TGGGGTGGT	TGGAGGGGTA	GTTAGTGGGG	3650	III	
3651	ATGGTGGTGG	GTTTGCAGGG	GTTGGTTGAT	ATGGAAATCA	CTTATGGTGG	3700		
3701	TGTTCACAA	GGAGGTGGCT	CATGGTTATT	GGTGGTGGCT	C	-		
				ATCTATATA		3750		
3751	TTTTTATAAG	AATATTATGT	ATTTTAACTA	TTTTTTACAT	ATTTTTTATT	3800		
3801	AAATTTTATG	CATTTGTTGG	ATTTTAAAT	AGTTTTTATC	GTACTTGTTT	3850		
3851	TATAAAATAT	TTATTATTTT	ATGTTTATA	TTATTACTTC	ATGTTATTTGA	3900		
3901	AATTTTCTCC	ATGTTTPTTT	CTTATTAT	AATAATTTTC	TATTTTTTTT	3950	IV	
3951	GTATTTTATT	ATGTTATTTT	TGTTTTTATA	ATAAATATT	ATTAATAAAA	4000		
4001	ATATTATTTT	TGTAAAATA	TATCATTTAC	AATGTTTAAA	AGTCATTTGT	4050		
4051	GAATATATTA	GCTAAGTTGT	ACTTGGTTT	GTCATTTTG	GTTGTTTACA	4100		
4101	TGCTATATAT	GATTCCTTGG	CCAAAACATG	TCTACTCTG	TCACTTGGGT	4150		
4151	TTTTTTTTTT	AAGACATATA	TAA			-		
			GGGGGT	AGAGT	ATG	AAGGCACT	4200	
4201	CAAGGTGCTT	GCTGCTTGGC	CGAGCGGGCC	ATGGAGGGG	GAGGCTGGCA	4250		
4251	TGGGCGTGG	GATTTGGGGG	CATGCACGGC	TGTTGGTGG	TAGTGGCCAG	4300	V	
4301	ATGTTGGCAA	CGGTTGTCAG	CAAGTACTGG	TGTTGGTGG	TAGTAACTCT	4350		
4351	GGTGGTG					-		

Мел. 3. (продовження).

	GGC	ATGCTGTGTG	GCGGGGATG	GCTTTTGCA	ACGGAAOEGC	4400	
4401	GGAGGGTGT	GCAAGTAGG	OCGCAAGGTT	CCATAAGCAT	GGGGCTAAGC	4450	
4451	TTAGTAWGLT	CGAAITGCA	TCAGTITGTT	CGGGCAAAAT	CGAGAGGGGA	4500	
4501	CATCGGTGT	GGGACTGAT	GCGTTTGGC	AACITGAAOAG	CGAGTGTJOG	4550	
4551	TCCAAGTAGC	GGCCAAAGT	CGGTGTGGCA	TGGGGTAAA	CTCAGTACGT	4600	
4601	TGGATITGDC	ATCGTITGTT	GTGAGTITGTT	TCGTGCATOG	CTCGTGGCGG	4650	
4651	TTGATGGGTT	TGGCAACTG	AAOAGAGAGG	CGTGTGCAA	GTAGGGCGCG	4700	
4701	AAGTITGGT	GCGATGGGG	CTAGCAGTA	TGTTCCGATT	GCCATCGATT	4750	
4751	GTTCGGGCA	ACATCGGGG	GCGACATGGC	TGTTGGCGGC	TGATGGCTTT	4800	
4801	TGGCAAGGTA	ACGGGAGGC	TTGTGCAAG	TAGGGCGCA	AGTGGCGGTG	4850	
4851	CGCATGGGCG	TAAAVTGGG	TAGTTCGGA	TTGCCATCGG	TTGTITGGAG	4900	
4901	TTGTGTGGG	CATGGCTGG	GGGGGCTGAT	GCGTTTGGC	AAOAGAGGG	4950	VI
4951	CGAGGCTGG	TGCAAGTAGC	GGCCAAAGT	CGGTGTGGCA	TGGGGCTAAG	5000	
5001	CTGAGTGGT	TGGTITGGC	ATCGATITGTT	GCGGGCAACA	TGGGGAGGGG	5050	
5051	ACATGGCTG	TGGGACTGA	TGGCTTTGG	CAAGGAAAG	GCGAGGGCTC	5100	
5101	GTGCAAGTAA	CGGGCAAGG	TGGGTGGCG	ATGGGGCTAA	GCTAAGTAA	5150	
5151	TGGGGTGGC	CATGGTITG	TGTAGTITGT	GTCTGGCATC	GCTGTGGCG	5200	
5201	GCTGATGGG	TTTGGCAAG	GAAOAGGAG	GCTTGTGGCA	AGTAGGGCGG	5250	
5251	CAAGGTGGG	TGGGCAAGG	GCTAAGCTCA	GTAGGTGGCA	ATTGGCATOG	5300	
5301	ATTGTGGGG	GCAACATGG	GAGGGACAT	CGCTGGTGGC	GCTGTAGTGG	5350	
5351	TTTGGGAGC	GGAACATGG	GCGCTGGTGG	AGTAGGGCGG	CGCAAGGTGG	5400	
5401	TGTGGGAGC	GGGCTAAGT	AAGTAGTGG	CGATTGGCAT	CGTITGTGTT	5450	
5451	GAGTITGGG	GCTAAGCT	CTTGGGGTGT	GATGGCTTT	GCCAAOAGAA	5500	
5501	CGGGAGGCG	TGATGCAAGT	AGCAOAGCA	GCTGGGGTGT	CGATGGGGTGT	5550	
5551	AAGCTAAGTA	CGTAGAGATT	GCCATOGATT	GTGGGGTCA	ACATGGGGTGG	5600	
5601	GCGCATGGC	TGTGGGAGC	TGATGGCTTT	TGGCAITGGA	ATGGGAGGGC	5650	
5651	CTGTGGCAAG	TAGGGCGCA	AGGTGGCGTGG	CGCATGGGGC	TGAGTITAGT	5700	
5701	ACATGGTAA	GCTGGTGGG	TTTGTGGGG	CTGTGGCTGT	GCTTTTATT	5750	
5751	TATGGTGGT	TGTGGTTA	T				
			ATACTGCA	TGGTGGTGGC	CTGGGGGGC	5800	
5801	TTGTCTGGC	TTTCAATGT	TGGCATTGGC	AACAACACAT	GGCTACGGGT	5850	
5851	CGGTGTGGG	GCTGTGTGG	GCCATGTATC	GGGAGGGCAA	GTTTACGGTGG	5900	
5901	GCCACATGG	TGGTITGGG	CTTGTGTGGC	TAGGTGGTAT	GCTTCTGTGT	5950	
5951	CGAGGAGGT	CGTAGGGCG	ATGCCATGTC	AGTCAITGCA	CAGGGCGAAA	6000	
6001	TTAGGCTGT	TGGGGTGGG	TTTCTGTGT	TGCATACCTA	ATGGCCAGGC	6050	VII
6051	ATTATCAAGC	ACAATGGT	GCTTTGGCC	CGTGGGTTC	GACGTGGGGG	6100	
6101	GTGAACAAA	AGTGGCAGTT	GTGTCCAGG	CCATCTGGC	TTGTGTGGC	6150	
6151	GATGTCTAGG	TCCATGACTA	GTATGCTGGG	ACTCTGGAT	TGGGTAAGG	6200	
6201	CAATGGGAT	GGGGCTTCA	TGTGTCTGA	TCGGGCAAA	GATGTCTGT	6250	
6251	TAGGAATGAC	GCTGTGGCT	GCTTGGACT	TGGGGTGGC	CTTGGGGTGG	6300	
6301	GCCATGCTCA	TGGGTGGGG	AGTCAATGA	GGAATGC			
6351	ctaccatag	tcalatctt	ctctcaaga	ttaaccatg	catgttaag	6350	
6401	tataaccata	tccactctt	accactcga	atactcatt	aatcattta	6400	
6451	tattttttt	atstttatct	actactcga	taacctatg	aattctaga	6450	

Мал. 3. (продовження).

N. sylvestris

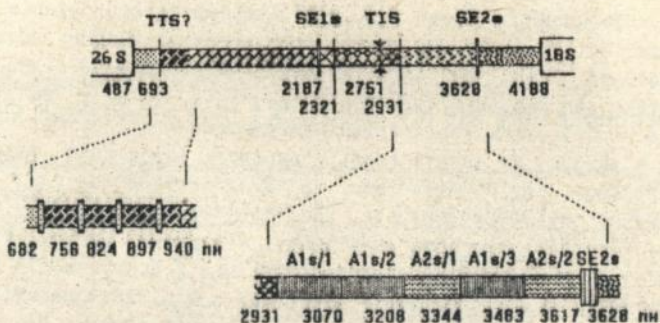
1	aaaticacca	astgttgwat	tgcticacca	ccaataranna	acttgaactg	50	
51	atitaaacc	gtcgttaaac	awttatatt	taccctactn	atwacagatn	100	
101	cacaataata	attcaaccta	gtacwafana	aacccttbat	tcgcacaait	150	
151	atcatatccg	cttwtttgaa	aaaccsattn	ctcnaaacta	cccttccctg	200	
201	atattatrac	gaacacctct	aatcakaat	ccnngctaga	awcwatgat	250	
251	gcacccwccg	tcgcctttcc	gaccscsat	awngcccttt	gcccccaat	300	
301	awcactatc	gttgctaaag	tcactcwnnc	awaaawccc	cnwtgccc	350	
351	cttgaagtac	aatttccatc	gagcncwsc	tasaatcctt	tgcaagcac	400	
401	ttaaataccg	gacnnggat	tstaartwnc	awartngcct	tcctaccacg	450	
451	atccactaac	attcaacccj	tgtcactcc	atitcct			
				OCT	CCCCCTGCAA	500	┌
501	TOCAATCAAT	TICTAACITTT	TOGAAAAGA	GGTTTACTOC	TTCCTTGAIG	550	
551	CTATATTATA	CTAAGGTGTG	GAAAATOGAA	CAAGTCTCAA	GACTTTGTAA	600	I
601	CGTATGCTAT	TTGTGTAT TA	AGTAGOCAAT	GTGACTTGAC	ACTTAGTCAT	650	
651	GTOGAGGAA	AGSITAAAC	AAATTTCACT	ACTAGAGGTT	TTT		└
					CGTGTGA	700	
701	TOGCTTGGGA	GGCCGAGGCC	TATGCCAAGG	GCGATGTGCC	AATACAATGC	750	
751	CGCAAGTAGA	GGATTTTCGT	TGTGTGCTT	GCGAGGCTA	TGDCAAITGT	800	Iia
801	GATGTGATAA	TACAAGTTAT	CAAGTAGAGG	TTTTTTGAGG	CGTGGGGGTG	850	
851	CGAGGCCAAG	GCACAAGCCA	AGAGTTGTGC	CAATCTATG	TOGGAAGTAG	900	
901	AGSITTTTCA	GGGTGTGCT	TGAGAGCCA	GGCCTATGCC			└
					GGGTGGCCA	950	
951	TGCAOGGGC	AGGACATGCC	CATGCCAOGA	GTGAGGAGT	GTCAGGACAT	1000	
1001	GGCAOGATC	AGGAOGTGC	AGGACGTGC	AGGATGTGTG	ATGGCAOGAG	1050	
1051	TAAGGAOBTG	TCAGSACATG	GCAGSACATG	GCAGSACATG	GCCATGGCAC	1100	
1101	GAGTCAGGAC	GTGTACGGAC	ATGGCCATGG	CAOGAGTCAG	GAGGTGTGAC	1150	
1151	GACATGGCAG	GAGTGGCCA	TGGCACAGAT	CAGGAOBTG	CAGGATGTGT	1200	
1201	GATGGCAOGA	TAAAGGAOGT	GTGAGGACAT	GGCAGGACAT	GGCCATGGCA	1250	
1251	OGAGTCAGGA	CGTGTACAGG	CATGGCATGA	CATGGCCATG	GCAGTGTGCA	1300	
1301	GCAGTGGCCA	GGAGTGTGTA	GGACATGGCC	ATGGCAOGAG	TCAGGA BTG	1350	
1351	ACAGGACATG	GCAGGACATG	GCAGGACATG	GCAGGACATG	GCCATGGCAC	1400	
1401	GAGTCAGGAC	GTGTACGGAC	ATGGCAGGAA	ATGGCAGGAC	ATGGCCATGG	1450	
1451	CAOBTGTACG	GAGGTGTACG	GACATCTCAT	GATGGCCATG	GCAGTGTGCA	1500	
1501	GGAGTGTGCA	GGACATGGCC	ATGGCAOGAG	TCAGGAOBTG	TCAGGACATG	1550	IIb
1551	GCAGGACATG	GCCATGGCAC	GTGTACGGAC	GTGCCAGGAC	GTCTTAGGAC	1600	
1601	ATGGCCATGG	CAOGAGTCAG	GAGTGTACG	GACATGGCC	CAOGTGGCCA	1650	
1651	TGGCAOAGT	CAGGAOBTG	CCATGGCAOG	TGTACGAGAG	TOGCAAGGACA	1700	
1701	TOGCCATGGC	AOGAGTCAGS	AOBTGTACGS	AOBTGTACGS	AOBTGTACGS	1750	
1751	ACATGGCAGG	ACATGGCAAT	GGCAOGATC	AGGAOBTGT	AGGACATGGC	1800	
1801	AGGACATGGC	CATGGCAOBT	GTGAGGAGBT	GTGAGGAGBT	GTGAGGACAT	1850	
1851	GGCAGGACAT	GGCAOGACAA	GCCCATGGCA	CGTGTACAGG	CGTGTACAGG	1900	
1901	CGTGTACAGG	CGTGTACAGG	CGTGGCCATG	GCAOBTGTGCA	GGAGTGTGCA	1950	
1951	GGAGTGTGTA	TGGCAOAGT	CAGGAOBTGT	CAAGGACATG	GCCATGGCAC	2000	
2001	GTGTACGGAC	GTGTACGGAC	GTGTACGGAC	AWTGCAGGAA	CGTGGCCATG	2050	
2051	GCAGTGTGCA	GGAGTGTGCA	GGACATGGCC	GGAGGAGBT	GCCATGGCCA	2100	
2101	GGTTCACACC	AGTGTGCACC	AGTGTGCACC	AOBTGTCTTC	AOBTOGCACC	2150	
2151	AOBTGTCTTC	AOBTGTGCACC	ATGCCAAGGG	CAATGC			└
				GTT	GGTGGAGGTG	2200	
2201	GTTOGAGGG	TAOGGGGGG	AOBTGTGTGCA	ATGCTTGGTG	GTGGGGGGG	2250	III
2251	GTGGTTTCAA	ATGGGAATCA	CTGTGTGTGG	TTGGGACAC	GGAGTGGCCT	2300	
2301	CATGCTTATT	GTGGTGTGT	C				└

Мал. 3. (продолжения).

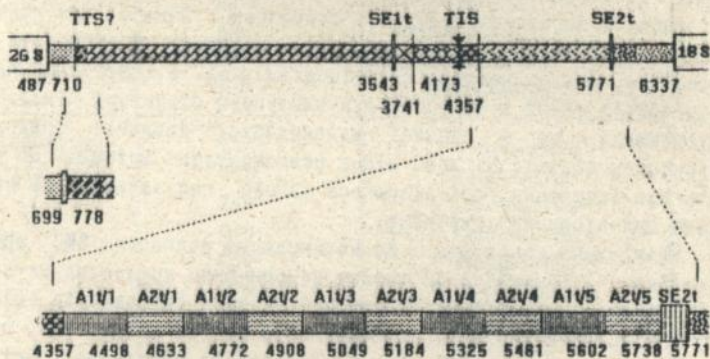
	ATCTATACA	CTTTATAAT	AATATTATGT	2350			
2351	ATTTTACCTA	TTTTTTATCT	ATTTTATTA	ATTTTATGC	ATTTTGTGA	2400	
2401	ATTTTAAATA	TTTTTTATG	TCACTTTTT	ATAAAAATAT	TTAATCTTAT	2450	
2451	ATTTTETATA	TTATTACAAG	ATGTATTGGA	ATTTTCTCOC	ATTTTTTTT	2500	
2501	CTATATTAT	AATAATTTTC	ATATTTTTA	GTATTTTAT	AATATTTTT	2550	
2551	CGTTTTTAA	TTAAAAATTT	TAAAAAATA	TATTTTATT	TGTAATAATA	2600	IV
2601	ATCATTTACA	ATGTTTAAATA	GTCAITTTG	AATATTTAT	CTATGTTGA	2650	
2651	CTTTGGTTG	TCTTATTGG	TGTTGTACAT	GTCTATTATG	ATTTCTGAC	2700	
2701	AAAGCATGTC	TACTCTGAA	AATTTGGTTT	TTTTTTTAA	AGCATATATA	2750	
2751	A						
	GGGGGGTAG	AGGTGTGAA	AGGCACCTCA	GGTGTTCCT	GCCAGJAAGG	2800	
2801	GGGGGCATG	CATGGGGGAT	GCTGGCATGG	GGGTGGGCA	TGGGGGCAT	2850	V
2851	CGTGGCTTG	TCTGTAGGT	CCCGATGTT	CGCAAACTG	GGGGCAAGT	2900	
2901	ACTCATGTTG	GCTGTAGTA	CGCTGGTGG	T			
			GACACGGCT	CGTGGCAAC		2950	
2951	ATTGGCTTTT	GGCAAGAAA	GGGGAGCAT	CATGCAAGTA	GGGTCCGGG	3000	
3001	TGGGTGGGC	ATGGGGGAA	GCTTAGTACA	TGTTGATGTC	CATTTGGATG	3050	
3051	TGGGGCAAA	ATGGGGAGC	GACATCGCTC	GGGGGCACT	GATGGCTTT	3100	
3101	GGCAACAGAA	AGGCTAAGCA	TGTGTCAAGT	AGGGCCGCA	GGTGGGCATG	3150	
3151	GGGGGAAGCT	TAGTAAAGTTG	CGGATTCACA	TGGTGTGTTG	CGGGCAACAT	3200	
3201	GGGGAGGGA	CATGGCTGTT	GGGGCTGAT	GGCTTTTGGC	AATAGAGGG	3250	
3251	CAAGGGTGG	TGCAAGTAGC	GGGGCAAGT	GCCATGGCA	TGGGGCAAG	3300	VI
3301	CTTAGTAGT	TGCTGATGTC	CATCGGTGTT	TGTTGGTTGT	GTCTGGAAC	3350	
3351	GCTTGGGGG	CTGATGCTTT	TTAGCAACAG	AAAGGCTAAG	CATGTGCAA	3400	
3401	GTAGCACCC	AAGGCTATGC	GCATGGGGG	AAGCTTAGTA	AGTTGGCGAT	3450	
3451	TGCATGGGT	TGTTGGGGG	AACATGGGA	GGGACATGG	CTGTGGGGG	3500	
3501	TGATGCTTT	GCAATAAGAA	CGGGCAAGC	ATGTGGCAAG	TAGGGCCGA	3550	
3551	AGGTGGCATG	GCCATGGGG	AAGCTTAGTA	AGTTGCCAAT	TGCATGGGT	3600	
3601	TGTTGGGGT	TGTTTGGG	ATTTCTCC				
			AA	CCCTTATTC	GTCCTTTGC	3650	
3651	GGGCTTGTG	TTGGCTTTGC	AATGTGGCA	TGGCAATAA	CACATGGCTG	3700	
3701	GGGTGGGGT	GTGGGGCTG	TTGTGGCTT	GTATGGGGA	GCCAAAGTGA	3750	
3751	CGTGGGCAC	ATGATGGGTG	TTGGGTTGT	GTGGCTAGGT	TGGATCCCTG	3800	
3801	CTTGGGAGC	GAGTCTCTG	CCGGCATGCC	ATCTCAATCA	TGTCACAAGC	3850	
3851	GCAAAATTAGG	CTTGTGGGTT	GTGGGTTTTC	TGTTGTGCAT	ACCTAATGCC	3900	VII
3901	AAGGCATTAT	CAAGGGCAAT	CGGTTGCCCT	TGGGGCTGG	CGTTGGAGGT	3950	
3951	GGGGGTGAA	CCAAAAGCTG	TAGTTGGTTC	CCAGAGTGG	CGTTGCTGT	4000	
4001	CGTTGGGATG	GCTTGGTCCA	TGACTTAGTAT	GCTGGGACTC	TGGGATGGG	4050	
4051	TAAAAGCAAT	GGGCATGGG	TCTTCATTTG	CTCTTATGTC	CAGGAATGCT	4100	
4101	CGTTAGCAAT	GAGGTTGGT	CTGGTCTTGG	ACTGGGGGTT	CGTTTGGGTC	4150	
4151	GGGCATGCTC	ATGGGATGCC	GGGGTCAATA	AGGAATGC			
4201	cttaccagta	gtcatatgct	tgtctcaaa	attaagccat	gcatgtgtaa	4200	
4251	gtataccaea	tccaaactgt	gaaaactcga	ataactcatt	aaatcaagta	4300	
4301	taatttgatt	gatgatctc	actactcga	taacctagt	aattctaga	4350	

Мал. 3 (закінчення). Нуклеотидна послідовність ВМС і ділянок, що прилягають, рДНК *N. tomentosiformis* і *N. sylvestris* (3'-кінець гену 26S рРНК і 5'-кінець гену 18S рРНК набрані дрібними літерами). Римські цифри позначають області ВМС.

N. sylvestris



N. tomentosiformis



- - область I ▣ - область II ⊠ - область III ⊞ - область IV
- ▤ - область V ▥ - область VI ▦ - область VII
- ▧ - A-субповтори ▨ - B-субповтори
- ▩ - C-субповтори ▪ - D-субповтори

Мал. 4. Організація BMC *N. sylvestris* і *N. tomentosiformis*.

ном. Область II має ряд копій варіантів субповторів типу С. (табл. 6). Деякі з цих субповторів присутні в рДНК обох видів *Nicotiana*, тоді як інші варіанти видоспецифічні. Область VI містить два варіанти субповтору типу А (А. та А2). На 5'-кінці області III є три копії сильно дивергуючих субповторів (тип В), які з'явилися на ранніх стадіях еволюції *Solanaceae* задовго до дивергенції родів *Nicotiana* та *Solanum*. Субповтори D-типу (близькі до С-субповторів) присутні тільки у ВМС *N.sylvestris*. Інші суттєві структурні відмінності між двома видами *Nicotiana* пов'язані з GT-багатою областю III, яка у *N.sylvestris* коротша. Крім того, у ВМС обох видів *Nicotiana* наявні видоспецифічні елементи на 3'-кінці області II та на 3'-кінці області VI.

Аналіз можливих вторинних структур у ВМС рДНК *Nicotiana* показав, що в областях V, VI та VII є декілька обернених повторів, які можуть формувати шпилькові структури. Цікаво, що найбільш досконала шпилькова структура була знайдена в області V у *Nicotiana*, але ця частина ВМС відсутня у ВМС *S.tuberosum*. Кожен А-субповтор також може формувати шпилькову структуру (мал. 5). Встановлено, що в процесі молекулярної еволюції шпилькових структур у області VI мали місце компенсаторні мутації. Це говорить про існування стабілізуючого добору, направленою на збереження цих вторинних структур.

Наші дані показують, що молекулярна еволюція ВМС рДНК у *Nicotiana* відбувалася як шляхом накопичення нуклеотидних замін, так і шляхом ампліфікації і делеції окремих субповторів (мал. 6, 7). Молекулярна еволюція А-субповторів носила концертний, узгоджений характер. Ампліфікація А-субповторів проходила порівняно акуратно: всі субповтори представлені повними копіями. Ампліфікація С-субповторів відбувалася частіше і більш хаотично, в результаті чого відповідна зона спейсеру являє собою комбінацію великої кількості коротких субповторів декількох підтипів спільного походження, які чергуються між собою без помітного порядку.

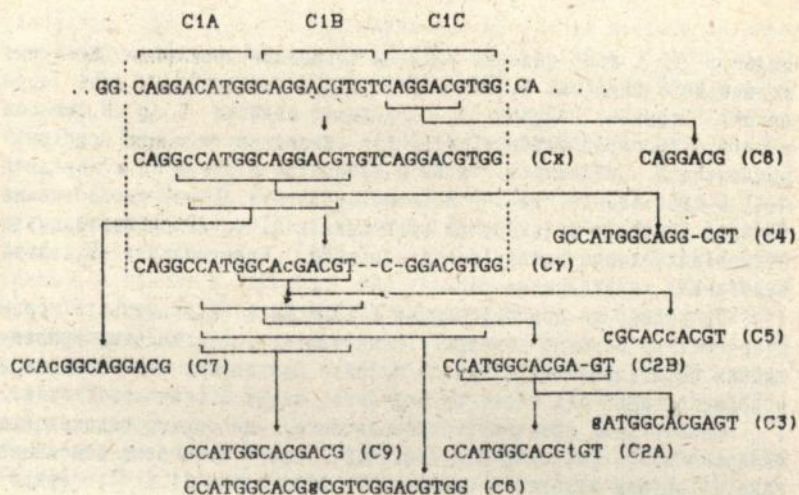
Співставлення послідовностей ВМС двох досліджених нами видів *Nicotiana* та *S.tuberosum* [Borisjuk, Hemleben, 1992] показує, що накопичення точкових мутацій відбувалося в різних областях з різною швидкістю (табл. 7): найбільш мінливими є області II і III, причому якщо у *S.tuberosum* область субповторів, що відповідає області II *Nicotiana* присутня, хоча гомологія між представниками різних родів тут не виявляється, то область III у картоплі відсутня взагалі.

Таблиця 6

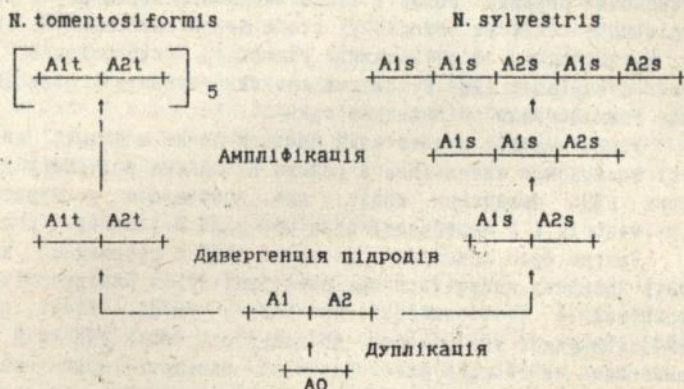
Конценсусні послідовності для найбільш поширених варіантів субповторів типу С в області ІІв ВМС рДНК *Nicotiana*.

Об'єкт	Назва варіанту субповтора	Конценсусна послідовність	Число копій
<i>N. sylvestris</i>	C1A	CACJACATGG	30
	C1B	CAGGACGTGG	6
	C1C	CAGGACGTGT	24
	C1D	CAGGACGTGG	10
	C2A	CCATGGCACGTGT	12
	C2B	CCATGGCACGAGT	13
	C3	GATGGCACGAGT	3
	C4	GCCATGGCACGGCGT	2
	C5	CGCACCACGT	7
<i>N. tomentosiformis</i>	C1A	CAGGACATGG	47
	C1B	CAGGACGTGG	5
	C1C	CAGGACGTGT	2
	C1E	CAGGACATGA	17
	C1F	AAGGACATGG	6
	C1G	CGGGACATGG	5
	C1H	CAGGGCGTGG	16
	C5	CGCACCACGT	2
	C6	CCATGGCACGGCGTCCGACGTGG	37
	C7	CCACGGCAGGACG	11
	C8	CAGGACG	11
C9	CCATGGCACGACG	30	

Примітка: В області ІІв ВМС присутні як субповтори, що співпадають з конценсусними послідовностями, так і субповтори, що виникли від наведених у таблиці внаслідок точкових замін, делецій та вставок нуклеотидів.



Мал. 6. Гіпотетична схема виникнення основних підтипів С-субповторів. Нуклеотиди, що змінилися в результаті точкових замін, набрані маленькими літерами.



Мал. 7. Гіпотетична схема молекулярної еволюції субповторів в зоні VI ВМС рДНК Nicotiana. A0 - предковий субповтор; A1, A2 - субповтори підтипів A1 і A2; A1t, A2t, A1s, A2s - субповтори A1 і A2 після дивергенції ліній "tomentosiformis" (підвид Tabacum) і "sylvestris" (підвид Petunioides).

області VI і вся область VII у *N. tabacum* практично ідентичні відповідним областям *N. tomentosiformis* - тут знайдені лише поодинокі точкові мутації. І лише область I у *N. tabacum* відрізняється від *N. tomentosiformis* делецією кількох сусідніх нуклеотидів. Области II та VI у *N. tabacum* містять ті ж варіанти А- і С-субповторів, що і у *N. tomentosiformis*. Більш того, значна частина точкових мутацій, що відрізняють А1 та А2 субповтори від відповідних консенсусних послідовностей, ідентична у *N. tomentosiformis* та *N. tabacum*.

Природно, що при порівнянні *N. tabacum* і *N. sylvestris* спостерігається помітна різниця. Таким чином, співставлення нуклеотидних послідовностей дозволяє зробити висновок, що *N. tabacum* успадкував рДНК від своєї батьківської форми *N. tomentosiformis*.

Наявні дані дозволяють стверджувати, що внутрішньогеномна гетерогенність ВМС як у *N. sylvestris*, так і *N. tabacum* пов'язана саме зі зміною кількості субповторів в областях II і VI. Зокрема, у короткого варіанту рДНК *N. tabacum* розмір області VI дорівнює такому у *N. tomentosiformis*, тоді як область II зменшилася приблизно на 1,6 тпн. Імовірно, це відбулося за рахунок зменшення кількості С-субповторів. У довгого варіанту рДНК *N. tabacum* довжина області II не змінилася порівняно з коротким варіантом, тоді як область VI стала довша приблизно на 800-850 пн. Це пов'язано зі збільшенням кількості А-субповторів. Тобто у довгого варіанту рДНК *N. tabacum* зменшення розмірів зони І₂ частково компенсовано збільшенням зони VI.

Таким чином, аналіз всіх наявних даних показує, що в процесі формування алоплоїдного геному *N. tabacum* відбулося перетворення рДНК предкових видів, яке проявилось у втраті рДНК *N. sylvestris* і в перебудові структури рДНК *N. tomentosiformis*.

Раніше було показано, що вміст рДНК в розрахунку на один набір хромосом знижується при зростанні рівня плоідності в родах *Nicotiana* і *Triticum-Aegilops* [Ward, 1973; Cullis, Davies, 1974]. Зокрема, вказувалося, що кількість копій рДНК у *N. tabacum* менше суми копій рДНК його батьків. Одержані нами результати підтверджують ці дані і дозволяють стверджувати, що зменшення питомого вмісту рДНК в геномі алотетраплоїдного *N. tabacum* відбувалося за рахунок елімінації рДНК *N. sylvestris*.

На цитологічному рівні інактивація частини рДНК при гібридизації проявляється як ядерцеве домінування. Тобто у гібридіє як правило активні ядра тільки одного з батьківських видів

[Navashin, 1927]. В наш час доведено, що ядерця містять активно транскрибовані тандемні блоки рДНК [Kaplan, 1993; Skorupska et al., 1989]. На хромосомах *N. tabacum* існує декілька блоків рДНК [Kenton et al., 1993], але активні ядерця формуються переважно блоками рДНК, успадкованими від батьківської форми, тоді як материнські блоки є неактивними. Цікаво відмітити, що на батьківських хромосомах у тетраплоїдному геномі присутній також додатковий активний рДНК блок, якого немає у близькоспорідних диплоїдних видів. Отже, рДНК *N. sylvestris* може бути представлена також і в геномі *N. tabacum*, але згідно нашим даним - дуже малою кількістю копій. Виходячи з наших даних можна описати можливі молекулярні події, пов'язані з еволюцією рДНК *N. tabacum*. 1 - ядерцеве домінування: після гібридизації двох диплоїдних батьківських видів рДНК з більш довгим ВМС (*N. tomentosiformis*) стала домінувати над рДНК з більш коротким ВМС (*N. sylvestris*); 2 - зменшення числа копій рДНК: транскрипційно неактивна рДНК (*N. sylvestris*) принаймні частково втрачалась з геному *N. tabacum*; 3 - перебудови рДНК: транскрипційно активна рДНК (*N. tomentosiformis*) підлягала змінам завдяки зменшенню числа субповторів у області II ВМС та збільшенню числа субповторів у області III.

Для злаків було показано, що у гібриді домінуючим є ядерцевий організатор, що містить рДНК з більшим розміром ВМС [Dvorak, 1993; Gustafson et al., 1988]. Наші дані показують, що аналогічний механізм контролює і ядерцеве домінування у *Nicotiana*. Таким чином, складається враження, що перетворення рДНК в зв'язку з ядерцевим домінуванням мають універсальний характер і підкоряються одним і тим же законам, щонайменше, у всіх покритонасінних рослин.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Отримані нами експериментальні дані свідчать, що видоутворення в обраних для дослідження модельних групах (*Nicotiana* та *Prunus*) було пов'язане з чисельними перебудовами на молекулярному рівні. Співставлення зібраної інформації з даними літератури дозволяє дійти висновку, що перебудови генетичного матеріалу у процесі еволюції є не випадковим: вони підкоряються певним закономірностям, які впливають з механізмів функціонування геному. Ці закономірності мають свої специфіку для різних таксономічних груп і накладають певні обмеження на молекулярну еволюцію.

Можна вказати на ряд внутрішніх особливостей організації геному, що мають безпосереднє значення для еволюції:

1) Взаємозв'язок між розміром ядра (точніше - співвідношенням між його об'ємом та площею поверхні), метаболічними процесами, (зокрема - інтенсивністю синтезу РНК та білків) та тривалістю клітинного циклу [Bennett, 1972; Narayan, 1988]; зміна розміру ядра внаслідок поліплоїдії або зміни розміру геному при збереженні незмінної кількості хромосом, які автоматично приводить до змін фізіолого-біохімічних та морфологічних параметрів.

2) Кругообіг ДНК (в першу чергу - ПП) у геномі [Финнеган и др., 1988; Flavell, 1980], молекулярний драйв, що є наслідком кругообігу та пов'язане з ними явище концертної еволюції [Доувер, 1986; Dover, Tautz, 1986]. Важливо, що процеси делецій/ампліфікацій, які лежать в основі кругообігу ДНК, пов'язані з перебудовами хромосомного апарату, тобто - з видоутворенням (формування бар'єрів репродуктивної ізоляції, вплив хромосомної локалізації на активність генів, тощо). Суттєво, що цей взаємозв'язок охоплює не тільки "надлишкову" ДНК, функція якої досі не з'ясована, але поширюється й на ділянки геному з відомими функціями (зокрема - на спейсерні ділянки рДНК).

Зв'язок між особливостями організації геному та видоутворенням дуже рельєфно видно при дослідженні каріотипічної еволюції (гібридизації, поліплоїдії, анеуплоїдії). Так, рівень подібності геномів є одним з факторів, що визначають можливий спосіб міжвидової гібридизації (алополіплоїдія або рекомбінаційне видоутворення). З другого боку, перебудови геному у гібридній формі в значній мірі детерміновані: гібридизація (а ще більше - анеуплоїдія) прискорить молекулярну еволюцію. Це проявляється як у інтенсифікації кругообігу ДНК (зникнення та поява деяких родин ПП, перебудова інших, так і у зростанні швидкості накопичення замін у структурних генах [Garcia-Orledo et al., 1978; Hutchinson et al., 1983]. Останнє викликане зниженням тиску стабілізуючого добору внаслідок дуплікації генів у поліплоїдів.

Найбільш докладно перебудови геному при алоплоїдії вивчені нами для рДНК (ядерцеве домінування). В цьому випадку функціональна супресія передує структурним перебудовам. Збачаємо, що аналогічне явище добре відоме на рівні цілого організму [Северцов, 1945; Северцов, 1990], але для молекулярного рівня встановлено вперше.

Що в стосується адаптивного значення перебудов геному, то

частина (скоріше за все - більша) молекулярних подій є селективно нейтральною, тоді як інша частина знаходиться під контролем добору. Зокрема було продемонстровано, що зміна розміру ВМС у рДНК за рахунок зростання кількості субповторів скоріше за все не мала адаптивного значення. Взагалі, значна частина виявлених нами перебудов геному може бути пояснена без використання ідеї добору. В той же час існує стабілізуючий добір, що зберігає певні вторинні структури у ВМС і особливо - первинну послідовність кодуючих ділянок та точки ініціації транскрипції.

Таким чином, при вивченні молекулярної еволюції ми маємо справу з комбінацією як випадково виникаючих змін, так і перебудов, що детерміновані самою організацією геному. Складається враження, що ці останні грають дуже важливу, можливо навіть визначальну роль. Інакше кажучи, особливості організації геному, його спонтанну здатність до самооновлення слід розглядати як важливий внутрішній еволюційний фактор.

ВИСНОВКИ

1. Активність синтезу РНК і білку у рослин понижується внаслідок підвищення рівня плідності. При цьому компонентний склад цитоплазматичних білків змінюється в незначній мірі.

2. Процеси поновлення наборів ПП проходять з високою швидкістю в роді *Nicotiana*, та з низькою - в роді *Prunus*. Між мінливістю геному на хромосомному і молекулярному рівнях організації існує взаємозв'язок. Перетворення геному є нерівномірними у часі: посилення делецій /ампліфікацій ПП, в тому числі - субповторів в ВМС рДНК, пов'язано з перебудовами каріотипу (кількості та морфології хромосом).

3. Ступінь мінливості за довжиною ВМС рДНК не однаковий в різних родах покритонасінних рослин. Збільшення розмірів ВМС в процесі еволюції не мало адаптивного значення, але було, імовірно, пов'язане з посиленням ампліфікації нуклеотидних послідовностей та змін каріотипу.

4. У ВМС рДНК видів роду *Nicotiana* можна виділити 7 областей, кожна з яких має видоспецифічні структурні особливості. Більша частина цих областей присутня і в рДНК *S. tuberosum*, що дозволяє говорити про спільність принципів організації рДНК в родині Solanaceae. Вказані області ВМС істотно різняться по швидкості молекулярної еволюції.

5. В рДНК *Nicotiana* виявлено 4 типи субповторів. Еволюція ВМС рДНК в цьому роді пов'язана з кількома циклами ампліфікації цих субповторів та їх частковою втратою. Молекулярна еволюція субповторів мала узгоджений (концертний) характер. Аналіз вторинних структур, що формуються субповторами типу А показав, що нуклеотидні заміни мали компенсаторний характер, що було пов'язано зі збереженням шпилькових структур в області VI ВМС.

6. Існує зв'язок між подібністю геному у схрещуваних видів та способом гібридизації. При рівні гомології 75% і вище більш імовірне рекомбінаційне видоутворення, 75% і нижче - алоплоїдне. Вивчення фракції III і, зокрема, рДНК підтверджує гіпотези про алоплоїдне походження *N.tabacum* від *N.sylvestris* і *N.tomentosiformis*, *P.domestica* - від *P.cerasifera* і *P.spinosa*, *P.cerasus* - від *P.fruticosa* і *P.avium*.

7. ПП в геномі алоплоїдних гібридів піддається ряду змін. Частина "старих" ПП втрачається, з'являються "нові" послідовності. Аналогічна картина спостерігається і для рДНК - у алоплоїдів виявлені три варіанти успадкування цих послідовностей: а) збереження рДНК обох батьків; б) збереження рДНК одного з батьків і елімінація рДНК іншого; в) поява нового варіанту рДНК внаслідок перетворення рДНК одного з батьківських видів.

8. Ядерцеве домінування у *Nicotiana* визначається структурою рДНК. Домінуючою є рДНК того виду, який має більший розмір ВМС. Функціонально активна, що знаходиться в домінуючому ядерцевому організаторі рДНК (успадкована від *N.tomentosiformis*) збереглася в еволюції алотетраплоїдного *N.tabacum*, тоді як неактивна рДНК (успадкована від *N.sylvestris*) була втрачена. рДНК *N.tomentosiformis* піддалася істотним перебудовам: мали місце делеція частини субповторів області II і ампліфікація субповторів області VI. Співставлення одержаних результатів і даних літератури показує, що молекулярні механізми ядерцевого домінування є універсальними як для дводольних, так і для однодольних рослин.

9. Перебудови геному починаються вже у гібридів першого покоління і продовжуються в подальшому. Геном алоплоїдного гібриду не є сумою геномів батьківських видів, а являє собою якісно нове утворення. Міжвидова гібридизація є генетичним стресом, що активує перетворення спадкового матеріалу на молекулярному рівні.

СПИСОК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Костышин С.С., Баканова Н.В., Волков Р.А., Славетная Г.П. Исследование изоферментного спектра некоторых оксидоредуктаз при гетерозисе у кукурузы // Черновцы: 1983. - 17 с. Рук. предст. Черновиц. ун-том, Деп. в ВИНТИ 19 февр. 1983, No 741-83.
2. Волков Р.А., Сидоренко Н.Н. Систематика как компонент теории в биологии // Философские проблемы современного естествознания. - 1984, - Вып. 57, - С. 88-95.
3. Мирошниченко Г.П., Волков Р.А. Образование парасексуальных гибридов между *Arabidopsis thaliana* и *Brassica campestris* может быть обусловлено сходством их ДНК // Докл. АН СССР, - 1984, - 278, No 2. - С. 489-493.
4. Мирошниченко Г.П., Волков Р.А., Борисюк Н.В. Структура геномов турнепса, арабидопсиса и их соматического гибрида // Биохимия. - 1986, - 51, No 1. - С. 84-94.
5. Волков Р.А., Костышин С.С., Мирошниченко Г.П. Организация геномов растений рода *Nicotiana* в связи с межвидовой гибридизацией // Биологические науки. - 1986, - No 6. - С. 16-22.
6. Волков Р.А., Мирошниченко Г.П. Элиминация полинуклеотидных последовательностей при видообразовании в роде *Nicotiana* // Журн. эволюцион. биохим. физиол. - 1987, - 23, No 4. - С. 487-491.
7. Мирошниченко Г.П., Волков Р.А., Костышин С.С. Дивергенция полинуклеотидных последовательностей у межвидовых гибридов пасленовых // Биохимия. - 1988, - 53, No 4. - С. 565-572.
8. Mirochnitchenko G.P., Borissyuk N.V., Volkov R.A., Gleba Ju.Ju. Les sequences repetitives des ADN chez *Arabidopsis thaliana*, *Brassica campestris* et leur hybride somatique, *Arabidobrassica* // *Arabidopsis Inform. Serv.* - 1988, - No 26, - P. 15-28.
9. Мирошниченко Г.П., Борисюк Н.В., Волков Р.А. Организация повторяющихся единиц в генах рРНК половых и соматических гибридов пасленовых // Биохимия. - 1989, - 54, No 4. - С. 669-675.
10. Волков Р.А., Костышин С.С., Мирошниченко Г.П. Изменение повторяющихся последовательностей ДНК растений при межвидовой гибридизации // Журн. общей биол. - 1989, - 50, No 4. - С. 446-457.
11. Борисюк Н.В., Костышин С.С., Волков Р.А., Мирошниченко Г.П. Строение генов рибосомных РНК у высших растений из рода *Nicotiana* // Молекул. биол. - 1989, - 23, No 4. - С. 1067-1074.
12. Волков Р.А., Борисюк Н.В., Костышин С.С., Мирошниченко Г.П. Изменение генов рибосомных РНК при межвидовой гибридизации

ции // Биологич. науки. - 1989. - No 10. - С. 92-100.

13. Волков Р.А., Костишин С.С., Панчук И.И. Сравнительное изучение организации генома кукурузы и некоторых других злаков // Пути повышения продуктивности, использования и охраны природных ресурсов Украинских Карпат и Прикарпатья: Сб. науч. трудов. - Киев, 1989. - С. 126-132.

14. Волков Р.А., Копыльчук Г.П., Оплачко Л.Т., Костишин С.С. Биохимические особенности при гетерозисе у растений на различных этапах реализации генетической информации // Природа, проявление и прогнозирование гетерозиса. Сб. научн. трудов. - Киев., Наук. думка. - 1992. - С. 84-92.

15. Волков Р.А., Борисюк Н.В., Костишин С.С., Панчук И.И. Изменчивость генов рРНК при перестройках хромосомного аппарата у табаков // Молекул. биол. - 1991. - 25, No 2. - С. 442-450.

16. Волков Р.А., Костишин С.С., Рогозинский М.С., Панчук И.И. Изменения в повторяющихся полинуклеотидных последовательностях при анеуплоидии у табаков // Журн. эволюцион. биохим. физиол. - 1992. - No 4. - С. 417-425.

17. Панчук И.И., Костишин С.С., Волков Р.А. Дивергенция повторяющихся полинуклеотидных последовательностей в подсемействе сливовых // Черновиц. ун-т. - Черновцы, 1991. - 15 с. - Деп. в УкрНИИТИ 04.09.91, No 1259 - УК 91.

18. Волков Р.А., Костишин С.С., Панчук И.И. Строение рДНК у представителей подсемейства Сливовых (Prunoideae) // Молекул. биол. - 1993. - 27, No 6. - С. 1358-1367.

19. Волков Р.А., Костишин С.С., Панчук И.И. Еволюція послідовностей, що повторюються в ДНК видів підродини Prunoideae // Укр. ботан. журн. - 1994. - No 2/3 - С. 110-115.

20. Язловицкая Л.С., Завалишина А.Н., Костишин С.С., Волков Р.А. Полиморфизм белков при изменении уровня ploидности у кукурузы // Физиол. биохим. культурн. растен. - 1993. - 25, No 5 - С. 472-478.

21. Волков Р.А., Костишин С.С., Тырнов В.С., Язловицкая Л.С. Интенсивность синтеза РНК у форм кукурузы с различным уровнем ploидности в норме и при воздействии фенола // Физиол. биохим. культурн. растен. - 1993. - 25, No 6 - С. 591-595.

22. Volkov R., Kostishin S., Ehrhardorfer F., Schweizer D. Organization and molecular evolution of rDNA external transcribed spacer region in two diploid relatives of *Nicotiana tabacum* // Plant Syst. Evol. - 1995. - in press.

Volkov R.A. Molecular and biochemical processes and karyological evolution in plants.

Dissertation for scientific degree of Doctor of Sciences (Biology) on the speciality 03.00.26. - molecular genetic, Chernivtsy State University, Chernivtsy, 1995.

The presumptive interactions between molecular and karyological evolution in plants has been studied.

It has been demonstrated that the molecular evolution in the genus *Nicotiana* was connected with the intensive rearrangements of repeated sequences (RS) by deletions and amplifications. However the intensity of these processes in the genus *Prunus* was essentially lower. The intensity of RS rearrangements correlates with the karyotype evolution.

rDNA variability has been measured by restriction mapping in the genera *Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum*, *Datura*, *Lycium* and *Prunus*. It has been found that lengths of the large intergenic spacers (IGS) are different for the major species studied. Only closely related species with identical karyotypes have equal IGS lengths and a very similar localization of restriction sites.

The rDNA organization was also compared in hybrids from the genera *Nicotiana* and *Prunus* and in its presumptive diploid progenitors. The following have been found (i) biparental (F1 hybrid *N.tabacum* x *N.glauca* and *P.cerasus*) or (ii) uniparental (*P.vulgaris*) inheritance of IGS organization, but (iii) the natural allopoloid *N.tabacum* has an IGS organization which differs from that parents (*N.sylvestris* and *N.tomentosiformis*).

rDNA IGS regions of *N.sylvestris* and *N.tomentosiformis* were cloned, sequenced and compared with the *N.tabacum* IGS sequence. This comparison shows that there are 7 regions in the IGS of all studied *Nicotiana* species, but that distinct structural features exist in all IGS regions of *N.sylvestris* and *N.tomentosiformis*. Regions I, III, IV, V and VII, 5'- and 3'-portion of regions II and VI in *N.tabacum* are practically identical to the respective regions in *N.tomentosiformis*. Thus it is possible to claim that *N.tabacum* inherited rDNA from the parental species *N.tomentosiformis*, but *tomentosiformis*-like rDNA underwent reconstruction by subrepeat deletions/amplifications (regions II and VI) during the evolution of the *N.tabacum* genome.

The mechanisms and factors of molecular evolution are discussed.

Волков Р.А. Молекулярно-биохимические процессы и кариотипическая эволюция растений.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.26. - молекулярная генетика, Черновицкий государственный университет, Черновцы, 1995.

В диссертационной работе изучается возможная взаимосвязь между молекулярной и кариотипической эволюцией у растений.

Было показано, что молекулярная эволюция рода *Nicotiana* связана с интенсивными перестройками повторяющихся последовательностей. Эти перестройки могут происходить путем делеций и амплификаций. Скорость этих процессов в роде *Prunus* была значительно ниже. Интенсивность перестроек повторяющихся последовательностей коррелирует с эволюцией кариотипа.

Вариабельность рДНК в родах *Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum*, *Datura*, *Lyrium* и *Prunus* оценивалась с помощью рестриктазного картирования. Было показано, что длины больших межгенных спейс-ров (БМС) отличаются у большинства изученных видов. Только очень близкие виды с идентичным кариотипом имели одинаковые длины БМС и очень сходные локализации сайтов узнавания рестриктаз.

Сравнивалась также организация рДНК у гибридов родов *Nicotiana* и *Prunus* и их предполагаемых диплоидных предков. Было обнаружено (i) двуродительское (F1 гибрид *N.tabacum* x *N.glausa* и *P.cerasus*) или (ii) одnorodительское (*P.vulgaris*) наследование строения БМС, но (iii) природный аллопloid *N.tabacum* имеет организацию БМС, которая отличается от таковой обоих родителей (*N.sylvestris* and *N.tomentosiformis*).

БМС генов рДНК *N.sylvestris* и *N.tomentosiformis* были клонированы, секвенированы и сравнены с полинуклеотидной последовательностью БМС *N.tabacum*. Это сравнение показало, что существует 7 областей в БМС всех изученных видов *Nicotiana*, но во всех областях БМС *N.sylvestris* и *N.tomentosiformis* имеются специфические особенности. Области I, III, IV, V и VII, 5'- и 3'-конец области II и VI у *N.tabacum* практически идентичны соответствующим областям у *N.tomentosiformis*. Таким образом, можно считать, что *N.tabacum* наследует рДНК от родительского вида *N.tomentosiformis*, но *tomentosiformis*-подобная рДНК подвергалась перестройкам путем делеций и амплификаций субповтория (область II и VI) в течение эволюции генома *N.tabacum*.

В работе обсуждаются механизмы и факторы молекулярной эволюции.

Ключові слова: експресія генів; полінуклеотидні послідовності, що повторюються; гени рРНК; великий мітгенний спейсер; клонування; сіквенування; молекулярна еволюція; каріотип; Nicotiana; Prunus.

Р. В. М.

Підписано до друку 14.12.95.
Формат 60х84/16.Папір друкарський.
Друк офсетний. Ум.друк.арк. 2,4.
Обл.-вид. арк. 2,5. Тираж 100 прим.
Зам.355.

Друкарня видавництва "Рута" Чернівецького держуніверситету
274012, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2

AB 33.732

AB 33.732