



КЛОНУВАННЯ І МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ДНК ХЛОРОПЛАСТІВ ТА МІТОХОНДРІЙ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV.

Р.О. МАКАРЕНКО¹, Б.В. ІВАЩУК¹, О.П. САВЧУК², А.Є. РУМЯНЦЕВА², М.Н. ЧЕРЕП³, Н.А. МАТВЄЄВА³,
М.В. КУЧУК³, Б.В. МОРГУН³

Анотація. Досліджено нуклеотидні послідовності фрагментів хлоропластної та мітохондріальної ДНК *Deschampsia antarctica*. Проведено порівняльний аналіз з нуклеотидними послідовностями вже відомих видів помірних широт на предмет визначення наявності та ступеню гомології геномів.

Ключові слова: *Deschampsia antarctica*, Антарктида, хлоропластний геном, мітохондріальний геном, секвенування

¹ Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

² Національний технічний університет України «КПІ»

³ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, 03680, Київ, Україна, www.icbge.org.ua, bmorgun@icbge.org.ua

Вступ

Судинні рослини в Антарктиді представлені лише двома видами: *Deschampsia antarctica* Desv. (родина Poaceae) та *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (родина Caryophyllaceae). Ареал поширення обидвох видів обмежується Південними Оркнейськими островами, Південними Шетландськими островами та узбережжям Антарктичного півострова, досягаючи 65°–68° південної широти. Окрім того, обидва види були знайдені в Америці. *C. quitensis* розповсюджений вздовж Анд до Мексики. Максимальний ареал *D. antarctica* сягає на півночі центрального Чилі неподалік Аргентини. Слід зазначити, що в зв'язку з підвищенням середньорічної температури, ареал рослин поступово зростає.

Науковий інтерес до цих рослин зумовлений насамперед їхніми адаптаційними можливостями до суворих кліматичних умов, таких як низькі температури та різкі їх коливання протягом доби, вплив високих доз ультрафіолетового випромінювання тощо. На сьогоднішній день існує ряд досліджень, які пов'язують механізми таких адаптацій з наявністю специфічних білків або ж особливостями структури мембран.

Під час даної роботи було клоновано та проведено порівняльний аналіз ділянок хлоропластного та мітохондріального геномів щучника антарктичного (*D. antarctica*) з метою уточнення ступеню спорідненості з іншими представниками родини злакових, та кращого

розуміння механізмів пристосування рослин до екстремальних умов довкілля.

Матеріали і методи досліджень

Зразки рослин *D. antarctica* були зібрані у 2010 році в районі української антарктичної станції «Академік Вернадський» на острові Галіндез. Рослини було введено в стерильну культуру шляхом поверхневої стерилізації та культивовано протягом тривалого часу *in vitro* (МАТВЄЄВА *та ін.* 2010).

Гомогенізацію рослинного матеріалу (0,8 г) здійснювали у буферному розчині, який вміщував сорбітол 0,33 М, трис 50 мМ, ЕДТА 25 мМ, β-меркаптоетанол 1%. Виділення пластид проводили у ступінчастому градієнті щільності сахарози, (52% і 30% відповідно) центрифугуванням при 18 тис. об./хв у роторі SW27. Мітохондрії виділяли відповідно WILSON & SNOUREY (1984). Органели лізували у буферному розчині, який вміщував трис 50 мМ, ЕДТА 25 мМ, β-меркаптоетанол 1%. Виділену ДНК піддавали депротейнізації, після чого гідролізували ендонуклеазою HindIII (Fermentas) відповідно до рекомендацій виробника. Отримані фрагменти ДНК були клоновані в плазмідний вектор pUC19. Після трансформації рекомбінантних плазмід в *Escherichia coli* штам XL-1 Blue, проводили відбір одиничних колоній та виділення плазмідної ДНК (SAM BROOK & RUSSELL 2001). Отримані препарати досліджували за допомогою рестрикційного

Табл. 1. Порівняльна характеристика деяких відібраних рекомбінантних клонів pDac за допомогою чотирьох ендонуклеаз рестрикції. Для більшої наочності клони впорядковано по величині вставки у HindIII сайт. Знак “-” означає, що аналіз не проводили. Розмір вставки вказано у п.н.

Table 1. Comparison characteristic of selected clones pDac with four restriction endonucleases. For more visibility clones were ordered by size in HindIII site. Mark “-” means that analysis wasn't made. Insert's size indicated in b.p.

Клон pDac	HindIII	HindIII, EcoRI, PstI	HindIII, EcoRI, SalI	HindIII, EcoRI, PstI, SalI
252.6	4000, 100	4000, 100	4000, 100	4000, 100
270.9	1700	-	-	-
270.10	1500	1500	1100, 400	1100, 400
295.3	1500	1000	1000	1000
293.7	1350	1000, 350	1350	1000, 350
305	1200, 100	-	-	-
252.1	1200	700, 500	700, 500	700, 500
252.7	1200	700, 500	700, 500	700, 500
252.10	1200	700, 500	700, 500	700, 500
283.5	1000	1000	1000	1000
285.7	1000	1000	1000	1000
307	1000	-	900, 100	900, 100
205.3	800, 700	-	-	-
270.4	800	600, 200	600, 200	600, 200
290.3	300	-	-	-
290.1	200	-	-	-

аналізу ферментами HindIII, EcoRI, PstI та SalI. Продукти рестрикції розділяли електрофорезом у агарозних гелях. Відібрані клони секвенувалися з праймеру M13REV. Порівняльний аналіз фрагментів зі вже відомими нуклеотидними послідовностями Генетичного банку (GenBank) (BENSON *et al.* 2011) здійснювався за допомогою програми Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) на сайті NCBI (2011).

Результати та їх обговорення

Дослідження проводилось в три етапи. На першому етапі проводилось виділення фрагментів хлоропластної ДНК, їх розмноження та відбір для секвенування. При цьому зустрічались фрагменти однакової довжини, для розділення яких використовувались три суміші різних ендонуклеаз рестрикції. Величина клонуваних послідовностей коливалася в межах від 200 до 4000 п.н.

На другому етапі проводилось секвенування відібраних фрагментів.

На третьому – аналіз просеквенуваних послідовностей та їх порівняння зі вже відомими

хлоропластними та мітохондріальними геномами.

Було отримано бібліотеку рекомбінантних плазмід, з яких було виділено біля двох десятків гетерологічних клонів. Десять клонів, які відрізнялися між собою і мали найдовші вставки було секвеновано. Порівняльний аналіз генетичних послідовностей вставок вказав на наступну гомологію:

Хлоропластні:

– pDac.3 Субодиноці NADH дегідрогенази злакових (*Triticum aestivum* L. та *Oriza sativa* L.);

– pDac.9 Бета-лактамаза, лак оперон, полілінкер різних векторів;

– pDac.15 Аспаргініл-тРНК синтетаза, глютамін синтетаза *Lycopersicon esculentum* Mill.;

– pDac.22 Субодиноці NADH дегідрогенази злакових (*T. aestivum* та *O. sativa*);

Мітохондріальні:

– pDac.270.1 Субодиноці NADH дегідрогенази *Triticum aestivum*;

– pDac.270.10 Рибосомальна РНК та відкрита рамка зчитування *Oriza sativa*;

– pDac.283.5 Субодиниці NADH дегідрогенази *Bambusa arnhemica* F. Muell.;

– pDac.295.3 Субодиниці NADH дегідрогенази злакових (*T. aestivum* та *O. sativa*).

Ще два клони 252.1 та 293.7 не вказали на наявність будь-якої гомології і потребують більш глибокого дослідження.

Наразі решта клонів готується до секвенування. Характеристика деяких проаналізованих клонів вказана в Таблиці 1.

Подальший відбір перспективних клонів та їх аналіз нададуть достовірніші дані про близькість *D. antarctica* з іншими видами рослин помірних широт, дозволить з'ясувати відмінності в послідовностях хлоропластних ДНК злаків. Дослідження організації геномів пластид антарктичних рослин розкриє молекулярні механізми адаптації до холоду, високого рівня ультрафіолетового опромінення, пролле світло на фактори, які індукують цвітіння та вегетацію вищих рослин в приморській Антарктиці.

Висновки

Виділено хлоропластну та мітохондріальну ДНК щучника антарктичного. Гідролізовані фрагменти геномних послідовностей ДНК

клоновано у вектор pUC19, в результаті чого створено бібліотеку рекомбінантних клонів. Здійснено відбір клонів з найдовшими вставками та їх секвенування.

Проведено аналіз нуклеотидних послідовностей фрагментів хлоропластного та мітохондріального геномів *D. antarctica*. Результати вказують на високу спорідненість хлоропластів та мітохондрій *D. antarctica* з представниками родини злакових: *Triticum aestivum*, *Oriza sativa*, *Bambusa arnhemica*, а також з *Lycopersicon esculentum*.

Використані джерела

- МАТВЕЕВА Н.А., БЕЛОКУРОВА В.Б., РУДАС В.А., ТЫЩЕНКО О.В., КУЧУК Н.В. 2010. Сохранение и микроразмножение *in vitro* растений Антарктики. *Биотехнология* 3: 33–41.
- BENSON D.A., KARSCH-MIZRACHI I., LIPMAN D.J., OSTELL J., SAYERS E.W. 2011. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan; 39 (Database issue): D32–7.
- NCBI 2011. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- SAMBROOK J. & RUSSELL D.W. 2001. *Molecular Cloning (a laboratory manual, third edition)*. Cold Spring Harbor, New York.
- WILSON A.J. & CHOUREY P.S. 1984. A rapid inexpensive method for the isolation of restrictable mitochondrial DNA from varies plant sources. *Plant Cell Rep.* 3: 237–239.

CLONING AND MOLECULAR GENETIC ANALYSES OF *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* DESV. CHLOROPLAST AND MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCES

R.O. MAKARENKO ¹, B.V. IVASHCHUK ¹, O.P. SAVCHUK ², A.E. RUMIANTSEVA ³, M.N. CHEREP ³, N.A. MATVEEVA ³, M.V. KUCHUK ³, B.V. MORGUN ³

Abstract. Chloroplast and mitochondrial DNA sequences of *Deschampsia antarctica* were studied. We had made comparison analysis with completely sequenced genomes of other temperateness plants to find homology.

Key words: *Deschampsia antarctica*, Antarctica, chloroplast genome, mitochondrial genome sequences

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv

² National Technical University of Ukraine "Kyiv Politechnic Institute"

³ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Akademika Zabolotnoho Str., 148, Kyiv, 03680, Ukraine, www.icbge.org.ua, bmorgun@icbge.org.ua