ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ

На правах рукописи

БОРИСЮК Николай Владимирович

УДК 577.123

НАСЛЕДОВАНИЕ И ОРГАНИЗАЦИЯ рДНК ПРИ СОМАТИЧЕСКОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ

03.00.03 - молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев - 1988

Работа выполнена в отделе цитофизиологии и клеточной инженерии Института ботаники им. Н.Г.Холодного АН УССР и в отделе эволюционной биохимии Межфакультетской проблемной научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии и биоорганической химии им. А.Н.Белозерского МГУ

Научный руководитель: академик АН УССР, доктор биологических наук Ю.Ю.Глеба

Официальные оппоненты: доктор биологических наук С.С.Малюта

доктор биологических наук Т.Г.Беридзе

Ведущая организация: Отдел биохимии и цитохимии Башкирского Научного центра АН СССР

Защита диссертации состоится "26" апреля 1988 г. в 10 часов на заседании специализированного совета К 016.11.01 при Институте молекулярной биологии и генетики АН УССР по адресу: 252627 Киев 143, ул. Заболотного, 24

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института

Автореферат разослан " " _____ 1988 г.

Ученый секретарь специализированного совета Л.Л.Лукаш

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Гибридизация растений на основе слияния изолированных протопластов добилась ряда существенных успехов в конструировании генетически новых форм растений. Получены фертильные гибриды между видами, которые невозможно было скрестить традиционным половым путем. Показана возможность получения соматических гибридов между филогенетически отдаленными видами, принадлежащими к разным родам, трибам и семействам. Соматические гибриды обычно существенно отличаются по своим морфо-генетическим характеристикам от родительских видов. Кроме того, сам процесс перехода клеток из существования в составе цельного растения к культивированию на искусственной среде приводит в ряде случаев к появлению среди регенерировавших из клеток растений линий с измененными характеристиками, наследуемыми в поколениях. Очевидно, что в основе наблюдаемой вариабельности лежат изменения генетического аппарата клеток, индуцируемые процессами гибридизации и/или культивирования клеток in vitro, что подтверждается наблюдаемыми на цитологических препаратах перестройками хромосом. Для дальнейшего успешного развития клеточной биотехнологии и генетической инженерии растений необходимо понимание закономерностей изменения геномов на уровне последовательностей ДНК.

Одним из наиболее изученных у растений является семейство тандемно повторяющихся последовательностей ДНК, кодирующих цитоплазматические рибосомальные РНК. Повторы рДНК состоят из консервативной части, кодирующей 18S рРНК, 5.8S и 26S рРНК, и так называемого нетранскрибируемого спейсера. Спейсерные последовательности рДНК значительно различаются как по длине, так и по последовательности нуклеотидов между растениями разных родов, видов и в некоторых случаях сортов и разновидностей. На основе различия длины рестриктных фрагментов рДНК родительских видов в геномах соматических гибридов можно различать специфичные для каждого родителя последовательности рДНК и выявлять количественные и качественные изменения, происходящие в этих последовательностях.

Резкое изменение условий существования растительных клеток в результате культивирования in vitro и гибридизации соматических клеток является сильным генетическим стрессом, дестабилизи-

рующим гомеостаз генома и значительно ускоряющим процессы перестроек генетического материала. Следовательно, соматические гибриды могут быть использованы в качестве модельной системы для изучения фундаментальных механизмов молекулярного эволюционирования геномов растений.

Цель и задачи исследования. Цель нашего исследования - разработка надежной системы доказательства гибридности форм растений, полученных в результате соматической гибридизации, на основе анализа ядерных последовательностей рДНК; изучение гетерогенности рДНК растений родительских линий при соматической гибридизации и организации рДНК в геномах соматических гибридов.

В задачи исследования входило: 1) изучить гетерогенность повторов рДНК всех растительных видов, использованных в качестве родителей при получении соматических гибридов; 2) провести анализ наследования и организации рДНК ряда линий межвидовых и межродовых гибридов и "гамма-гибридов"; 3) провести количественный анализ видоспецифических последовательностей рибосомальных генов соматических гибридов.

Научная новизна и практическая ценность. Впервые построены рестриктные карты повторов рДНК пяти видов семейства пасленовых и двух видов крестоцветных. В рДНК пасленовых и крестоцветных выявлено специфичное для этих семейств расположение сайтов рестриктазы EcoR1 в кодирующих областях.

Обнаружена и количественно оценена значительная деамплификация рДНК, происшедшая в результате соматической гибридизации в некоторых комбинациях видов. Получено экспериментальное доказательство модели эволюционирования последовательностей рДНК растений путем неравного кроссинговера.

Впервые в соматических гибридах обнаружен новый класс повторов рДНК, отсутствующих у родительских видов. Впервые показана преимущественная сохранность рДНК облучавшихся суперлетальными дозами родительских клеток в "гамма-гибридах".

Полученные результаты углубляют представления о молекулярных механизмах эволюционирования геномов растений и могут найти применение в практической селекции табаков, капусты, рапса, турнепса. Последовательности рДНК могут быть использованы в качестве маркеров ядерных геномов при получении гибридов. Способность рДНК отвечать на стрессовые воздействия изменением количества копий открывает возможность использования последовательностей ри-

босомальных генов с целью конструирований амплифицирующихся векторов для трансформации растений.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на Республиканском симпозиуме "Биохимические механизмы регуляции генетической активности" (Канев, май 1984 г.); на Всесоюзной конференции "Новые направления биотехнологии" (Пущино-на-Оке, октябрь 1986 г.); на Всесоюзной конференции "Хемосистематика и эволюционная биохимия растений" (Москва, ноябрь 1986 г.); на VI Всесоюзном симпозиуме "Молекулярные механизмы генетических процессов" (Москва, февраль 1987 г.); на Всесоюзной конференции "Структура и функции клеточного ядра" (Черноголовка, апрель 1987 г.); на XIV Международном ботаническом конгрессе (Зап.Берлин, август 1987 г.); на Международном симпозиуме "Генетическая инженерия растений" (Пущино-на-Оке, октябрь 1987 г.); на конференции молодых ученых "Изучение, охрана и рациональное использование природных ресурсов" (Уфа, октябрь 1987 г.), а также на научных семинарах отдела цитофизиологии и клеточной инженерии Института ботаники им. Н.Г.Холодного АН УССР и отдела эволюционной биохимии Межфакультетской проблемной научно-исследовательской лаборатории МГУ.

Публикации. Основные результаты диссертации отражены в семи печатных работах, список которых приводится в конце автореферата.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, глав "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты и обсуждение", выводов и списка использованной литературы, включающего 203 библиографические ссылки, 184 из которых иностранные. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста, содержит 33 рисунка, включающих 43 фотографии, и 2 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все использованные линии соматических гибридов получены в отделе цитофизиологии и клеточной инженерии Института ботаники им. Н.Г.Холодного АН УССР. Растения Brassica campestris, B. oleracea, B. napus выращивались в теплице из семян, любезно предоставленных проф. В.Ф.Пересыпкиным (УСХА, Киев).

ДНК выделяли на различных этапах работы тремя методами (Bendich et al., 1980; Murray, Thompson, 1980; Shure et al., 1983). Во всех случаях для получения высокополимерной ДНК, хорошо расщепляемой рестриктазами, проводили очистку в градиенте плотности CsCl. Рестрикцию, электрофорез, перенос фрагментов ДНК на нитро-

целлюлозный фильтр и гибридизацию по Саузерну проводили как описано (Маниатис и др., 1984).

В качестве зондов использовали меченные ^{32}P 18S рРНК и 26S рРНК кукурузы и плазмиду pUL7, содержащую 3'-концевой фрагмент последовательности 26S рДНК лимона длиной около 500 пн (плазмида любезно предоставлена И.Федором и В.О.Колошей, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов, Пущино-на-Оке). 18S и 26S рРНК выделяли по методике (Oono, Sugiura, 1980) из этиолированных проростков кукурузы и метили ^{32}P с использованием Т4 полинуклеотидкиназы (Bedbrook, 1982).

Денситометрирование радиоавтографов проводили на микроденситометре с интегрирующим устройством ("Joyce-Loebl", Англия).

Гибридизацию в пятнах проводили как описано (Anderson, Young, 1985) с некоторыми модификациями. Аналитическое ультрацентрифугирование ДНК с целью выявления сателлитных компонентов проводили на ультрацентрифуге Spinco-E ("Beckman", США) со сканирующим устройством.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Рестриктное картирование повторов рДНК родительских видов.

Для всех растительных видов, использовавшихся в качестве родителей при получении соматических гибридов, построены рестриктные карты рДНК. Выявленные межвидовые различия в организации р-повторов позволили использовать рДНК в качестве маркеров ядерных геномов родительских линий при анализе соматических гибридов, а также сделать некоторые выводы о филогенетических взаимоотношениях изучаемых видов.

Выбор рестриктаз был обусловлен их доступностью, способностью полностью переваривать растительную ДНК и наличием в кодирующей части рДНК консервативных сайтов. Основываясь на этих соображениях, картирование проводили по сайтам узнавания рестриктаз EcoR1 и EcoRV (рис. I). В качестве зондов,специфичных к рДНК, использовали меченные ^{32}P 18S рРНК, 26S рРНК кукурузы и плазмиду pUL7.

У всех пяти видов табаков и красавки обнаружены EcoR1 сайты в последовательности 26S рДНК, примыкающей к внутреннему транскрибируемому спейсеру, в дополнение к общим для большинства растений сайтам EcoR1 в 3'-концевых последовательностях 18S и 26S рДНК. EcoR1 сайты в 5'-концевой последовательности 26S рДНК выяв-

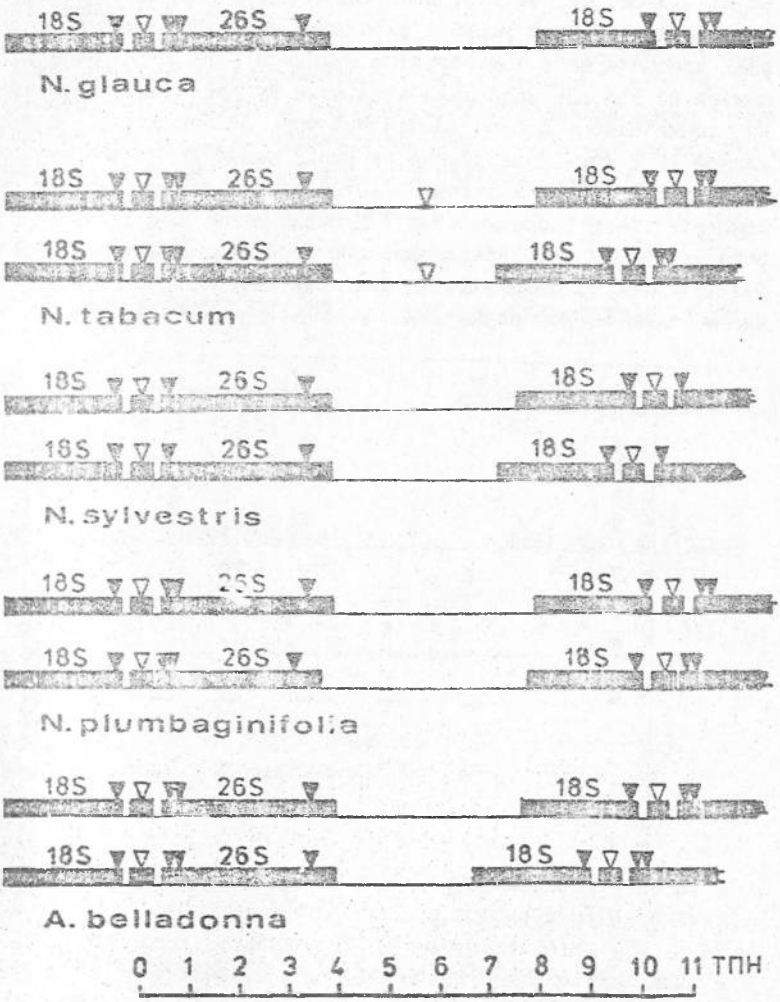


Рис.I. Рестриктные карты рДНК Nicotiana glauca, N. tabacum, N. sylvestris, N. plumbaginifolia и красавки, Atropa belladonna. ▼-сайт узнавания рестриктазы EcoR1, ▽-сайт узнавания EcoRV.

лены также у петунии (Waldren et al., 1983) и томата (Vallejos et al., 1986) и, видимо, являются специфичными для пасленовых. Наличие двух сайтов EcoR1 в 5'-области 26S рДНК обоих повторов рДНК красавки было подтверждено анализом рДНК линий NA-6 и DA-1, каждая из которых содержала лишь один из двух р-повторов красавки, линия NA-6 - повтор длиной 9,4 тпн, а линия ДА-I - повтор длиной I0,2 тпн. Приведенная на рис.2 схема EcoR1-фрагментов рДНК 5 видов табаков и красавки свидетельствует о значительной гетерогенности генов рибосомальных РНК пасленовых, обусловленной варьированием длины нетранскрибируемого спейсера. Кроме того у N. sylvestris и N. plumbaginifolia выявлены изменения в транскрибируемых последовательностях рДНК.

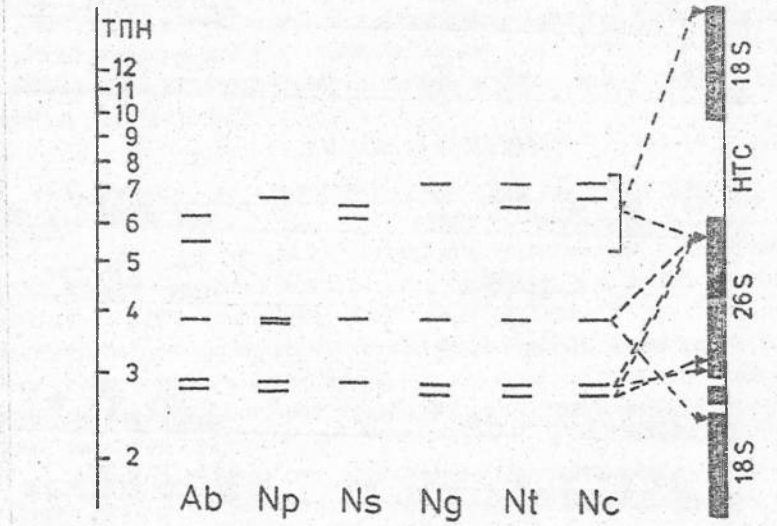


Рис.2. Распределение по длине EcoR1-фрагментов ДНК пасленовых, гибридизующихся с 18S и 26S рРНК.

Обнаруженная нами гетерогенность длины повторяющихся единиц рДНК табаков выше, чем в роде Vicia (Lamppa et al., 1984) и у триллиевых (Yakura et al., 1983) и сравнима с гетерогенностью рДНК тыквенных (Zanal, Hemleben, 1986) и трибы Cynareae (Pucci,

Maggini, 1986).

Построены также рестриктные карты рибосомальных повторов двух видов семейства крестоцветных - Brassica campestris и B. oleracea. Как следует из рис.3, в геноме турнепса кроме р-повтора длиной 10.0 тпн, идентичного повтору рДНК B. oleracea, содержится еще один класс рДНК с длиной повторов 9.15 тпн.

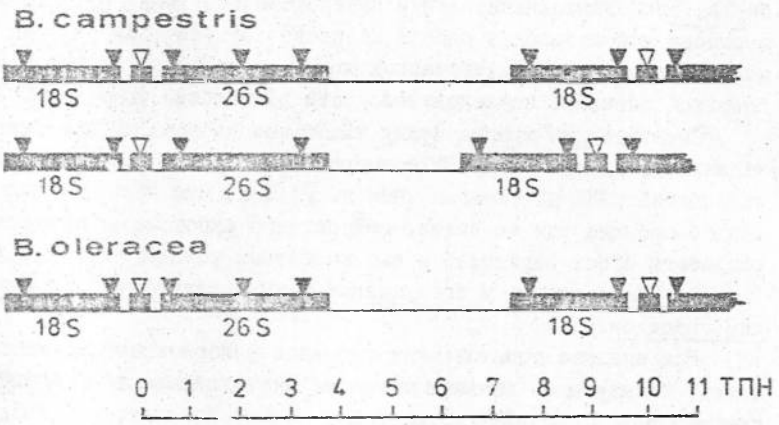


Рис.3. Рестриктные карты повторов рДНК Brassica campastris и Brassica oleracea. ∇-сайт узнавания рестриктазы EcoR1, ∇-сайт EcoRV.

В геноме рапса, природного гибрида B. campestris и B. oleracea кроме специфичных для родителей фрагментов рДНК, выявлен новый EcoR1-фрагмент, содержащий последовательность НТС. Видимо, появление нового фрагмента рДНК, по сравнению с родительскими геномами, обусловлено возникновением нового сайта узнавания рестриктазы EcoR1 в области нетранскрибируемого спейсера рапса в процессе независимого эволюционирования.

В повторах рДНК капусты, турнепса и рапса, также как у арабидопсиса (Pruitt, Meyerowitz, 1986) и редиса (Delseny et al., 1985) имеются специфичные для семейства крестоцветных сайты рестриктазы EcoR1 в 5'-области гена 18S рРНК и во внутренней части последовательности 26S рДНК.

2. Наследование рДНК у межвидовых соматических гибридов.

Анализ последовательностей рДНК межвидовых соматических гибридов Nicotiana tabacum + N. plumbaginifolia, N. tabacum + N. glauca, N. plumbaginifolia + N. sylvestris проводили с использованием зонда pUL7, содержащего последовательность 26S рДНК, примыкающую к НТС. Как было показано при построении рестриктных карт, спейсеры, разделяющие кодирующие последовательности рДНК табаков, проявляют значительную гетерогенность по длине, что легло в основу использования рДНК в качестве маркера родительских геномов. Во всех проанализированных линиях межвидовых соматических гибридов выявлены последовательности рДНК обоих родителей.

Соматический гибрид между Nicotiana tabacum и древовидным табаком N. glauca содержит примерно в два раза меньше последовательностей рДНК N. tabacum, чем N. glauca, что отличает его от полового гибрида тех же видов, содержащего рибосомальные последовательности обоих родителей в эквивалентных количествах (рис.4).

3. Наследование и организация рДНК у отдаленных соматических гибридов.

При анализе соматических гибридов филогенетически отдаленных видов в гибридных геномах выявлены значительные перестройки последовательностей рДНК родителей.

У межтрибного гибрида Arabidobrassica, полученного в результате слияния протопластов Arabidopsis thaliana и Brassica campestris (Gleba, Hoffman, 1978),выявлена рДНК арабидопсиса и лишь один из двух классов повторов рДНК турнепса (рис.5). Известно, что в геномах пшеницы (Appels et al., 1980), ячменя (Appels et al., 1980), гороха (Ellis et al., 1984) рибосомальные повторы разной длины локализованы на разных хромосомах. Анализируемая линия содержит 30-40 хромосом арабидопсиса и лишь одну-две хромосомы турнепса (Глеба, Сытник, 1984). Очевидно, в геноме Arabidobrassica сохранилась только одна из двух ядрышкосодержащих хромосом турнепса. Такие асимметричные гибриды, несущие весь набор хромосом одного родителя и только одну или несколько хромосом другого, могут быть полезными при составлении хромосомных карт хозяйственно важных культур. Большинство генов человека картировано на хромосомах с применением именно такого "клонирования" отдельных человеческих хромосом в клетках мыши или китайского хомячка (Kao et al., 1980).

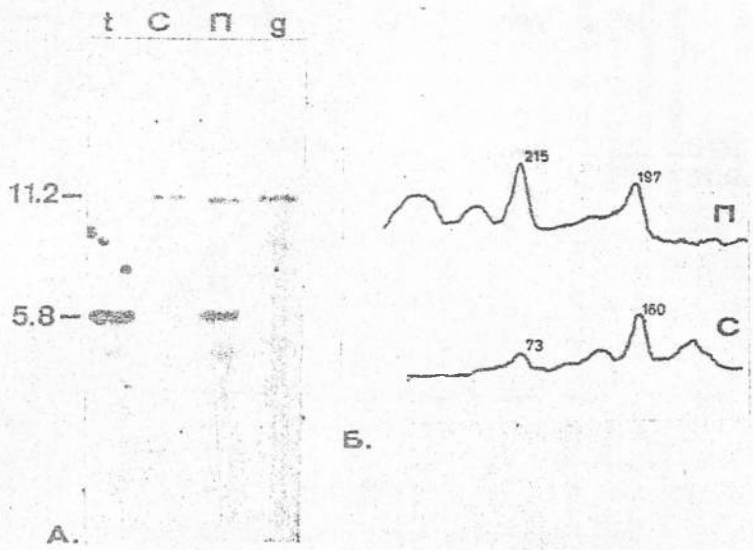
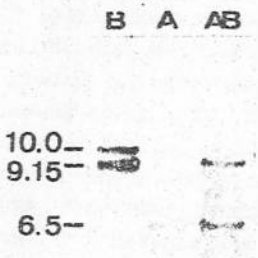


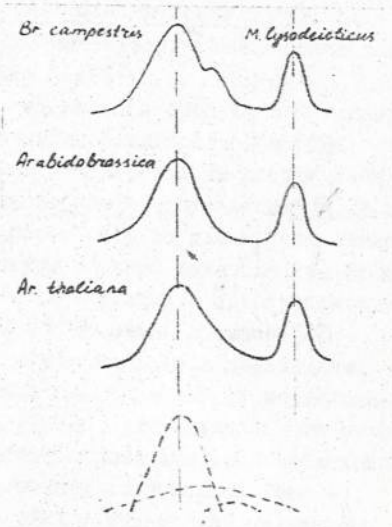
Рис.4. Наследование рДНК соматическим (с) и половым (п) гибридами Nicotiana tabacum + Nicotiana glauca. А. Радиоавтограф гибридизации EcoRV-фрагментов ДНК родительских видов и гибридов с меченным ^{32}P зондом pUL7. Б. Результат денситометрирования радиоавтографов треков полового (п) и соматического (с) гибридов. Результат интегрирования пиков отражен в цифрах над пиками.

На рис.6 предоставлены результаты аналитического ультрацентрифугирования ДНК арабидопсиса, турнепса и Arabidobrassica в нейтральном градиенте CsCl. В ДНК турнепса выявляется четко выраженный сателлитный компонент. В работе Беридзе (1976) показано, что 24% ядерной ДНК турнепса входит в состав сателлитного компонента.

О присутствии скрытого сателлита в ДНК арабидопсиса свидетельствует асимметричность пика. При анализе на ЭВМ (по программе, любезно предоставленной Т.Г.Беридзе) этот пик удалось разложить на три компонента, что подтверждает наличие у арабидопсиса обогащенной ГЦ-парами сателлитной фракции. Симметричность пика ДНК Arabidobrassica свидетельствует об утрате соматическим гиб-



5.



6.

Рис.5. Радиоавтографы полос гибридизации EcoRV-фрагментов ДНК арабидопсиса (A), турнепса (B) и Arabidobrassica (AB) с зондом pUL7. Цифрами обозначены размеры фрагментов в тпн.

Рис.6. Выявление сателлитных компонентов в ДНК турнепса, арабидопсиса и Arabidobrassica. В качестве стандарта плотности использовали ДНК Micrococcus lisodeikticus. В нижней части рисунка представлено разложение пика ДНК арабидопсиса на составные компоненты.

ридом хромосом или фрагментов хромосом, несущих сатДНК.

Анализ организации рибосомальных генов у четырех гибридных линий, полученных в результате слияния протопластов китайского табака и красавки (Gleba et al., 1982) выявил значительное уменьшение количества последовательностей рДНК у гибридов по сравнению с родительскими линиями (рис.7).

Исходя из результатов количественного определения на фильтрах связывания ДНК родительских видов и гибридов с рДНК-специфичным зондом, цитофотометрического определения количества ДНК в ядрах гибридов и родительских клеток, а также результатов денситометрирования радиоавтографов полос гибридизации EcoR1 фрагментов ДНК гибридных линий с зондом pUL7 и интегрирования пиков показано, что гибридные линии содержат лишь 10-20% последовательностей рДНК табака, 5-10% последовательностей рДНК красавки.

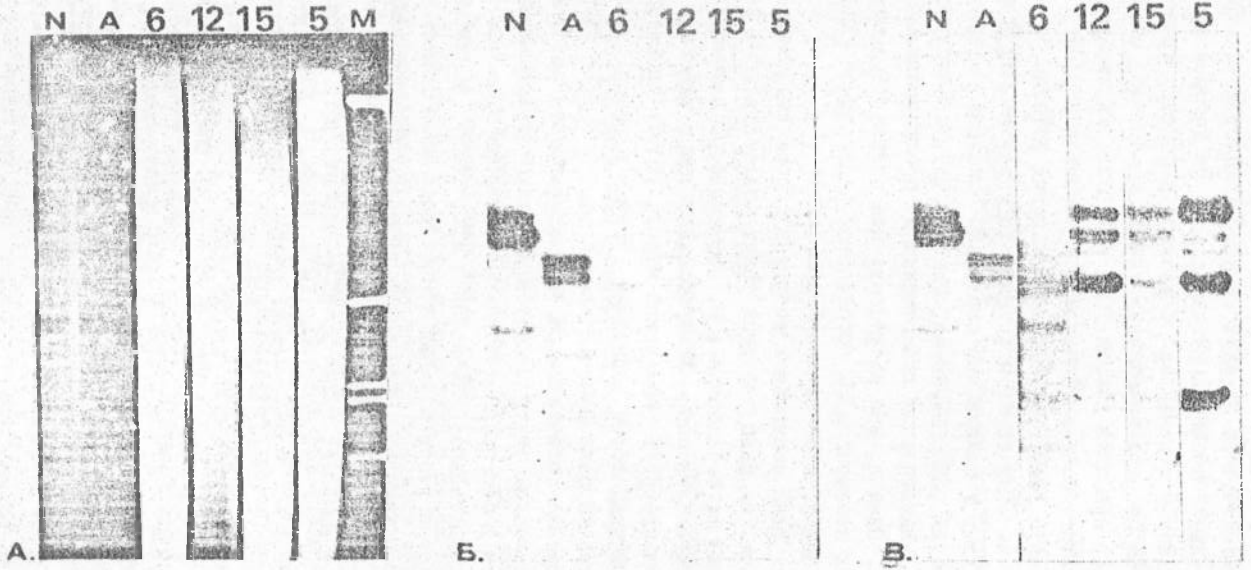


Рис.7. Уменьшение количества последовательностей рДНК у соматических гибридов N. chinensis + A. belladonna. А. Электрофореграмма разделения EcoR1-фрагментов ДНК табака (N), красавки (А) и гибридных линий 6, 12, 15, 5. М - EcoR1-фрагменты ДНК фага λ, использовавшиеся в качестве стандартов молекулярной массы. На гель наносили по 3 мкг ДНК родительских видов и по 9 мкг ДНК гибридов. Б, В. Радиоавтографы гибридизующихся с зондом pUL7 фрагментов ДНК. Б. Время экспозиции 48 часов; В. Время экспозиции треков, содержащих ДНК гибридов, 20 суток.

Следует отметить, что во всех линиях выявляется только одна полоса гибридизации с видроспецифичным для A. belladonna фрагментом рДНК, принадлежащим меньшему по размеру р-повтору красавки. Очевидно, во всех проанализированных линиях хромосома, несущая рибосомный повтор красавки длиной I0,2 тпн, была элиминирована.

Наши результаты по значительной деамплификации рДНК у соматических гибридов согласуются с данными других авторов об изменении числа рибосомальных генов в результате гибридизации и культивирования in vitro. У сомаклонов картофеля показана потеря 70% последовательностей рДНК (Landsman, Uhrig, 1985). Молекулярные механизмы такой значительной деамплификации последовательностей рДНК неизвестны. Однако, это могут быть или делеции больших фрагментов тандемных повторов рДНК посредством реципрокной рекомбинации (Flavell, 1985), либо неравный кроссинговер.

При анализе рДНК межтрибных гибридов Atropa belladonna + Nicptiana tabacum не было выявлено таких количественных различий, как в случае A. belladonna + N. chinensis. В линиях I и 43, полученных в результате слияния опухолевых клеток табака и протопластов мезофила красавки (Каневский и др., I985), выявлены последовательности рДНК обоих родителей, причем в обоих линиях количество рДНК табака было значительно меньше, чем рДНК красавки.

Такое отношение количества последовательностей рибосомальных генов родительских видов является довольно неожиданным, так как клетки линий I содержали только треть набора хромосом красавки и все хромосомы табака (Каневский и др., I985). Возможно, увеличенное количество рибосомальных генов красавки в данном случае является частью механизма, приостанавливающего процесс элиминации хромосом красавки на определенном количественном уровне.

В гибридной линии 2, кроме EcoR1-фрагмента рДНК красавки длиной 5,5 тпн и двух слабых полос гибридизации с фрагментами 6,5 и 7,4 тпн, соответствующих рДНК табака, обнаружены новые фрагменты рДНК, отсутствующие у родительских линий. Специфичные для линии 2 фрагменты рДНК длиной 6,I5 и 6,45 тпн, соответственно на I50 нуклеотидов меньше и больше фрагмента размером 6,3 тпн, обычно выявляемого в геноме красавки (рис.8).

Обнаруженная нами дупликация фрагмента рДНК красавки в геноме соматического гибрида является, видимо, первым экспериментальным доказательством гипотезы Флейвелла (Flavell, 1985), объясняющей образование новых классов повторов рДНК растений неравным

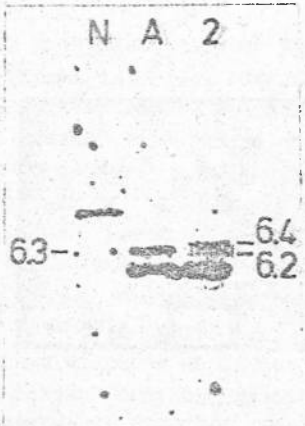


Рис.8. Радиоавтограф гибридизации EcoR1-фрагментов ДНК красавки (A), табака (N) и их соматического гибрида линии 2(2) с зондом pUL7. У соматического гибрида линии 2 вместо фрагмента рДНК красавки длиной 6,3 тпн обнаруживаются два новых фрагмента 6,15 и 6,45 тпн, которые, видимо, являются результатом неравного кроссинговера

кроссинговером.

В линии NtAb-1 обнаружен новый класс повторов рДНК, не выявляемый у родительских видов (рис.9).

Образование нового класса рДНК у линии NtAb-1 показано также при гибридизации EcoR1-фрагментов с зондом pUL7 и 18S рРНК. Новый фрагмент ДНК длиной 8,3 тпн выявляется у гибридной линии NtAb-1 также при гибридизации ДНК рестрицированной эндонуклеазой BamH1 с зондом pUL7. Возможны несколько механизмов, объясняющих образование нового класса рДНК в процессе соматической гибридизации: 1) повтор рДНК, обнаруженный в гибридной линии NtAb-1, присутствовал в геноме одного из родителей в малом количестве копий (следовательно не обнаруживался с помощью блот-гибридизации), однако амплифицировался в гибридных клетках. В мутантах Xenopus Laevis, лишенных ядрышек, были обнаружены низкокопийные последовательности, гомологичные рДНК (Tashiro et al., 1986); 2) новый

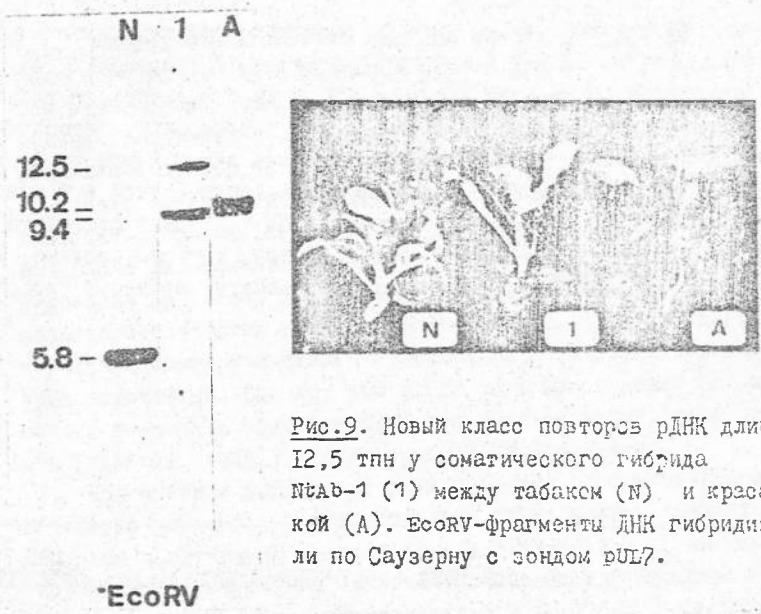


Рис.9. Новый класс повторов рДНК длиной I2,5 тпн у соматического гибрида NtAb-1 (1) между табаком (N) и красавкой (A). EcoRV-фрагменты ДНК гибридизовали по Саузерну с зондом pUL7.

вариант повтора рДНК обусловлен инсерцией транспазоноподобного элемента в один или несколько р-повторов одного из родителей с последующей его амплификацией; 3) возникновение нового класса рДНК у соматического гибрида обусловлено неравным кроссинговером.

Клонирование и секвенирование образовавшейся в процессе соматической гибридизации последовательности рДНК представляет чрезвычайный интерес, так как данная модельная система позволяет выявить механизмы образования и размножения в геноме новых вариантов генов, что является основой эволюционирования живых систем.

4. Наследование рДНК у "гамма"-гибридов.

Были исследованы гибридные линии, полученные в результате слияния протопластов Nicotiana plumbaginifolia и клеток N. sylvestris, облучавшихся дозами 500 и I000 Гр, а также линии межтрибных гибридов N. plumbaginifolia + Atropa belladonna, при создании которых клетки красавки облучались дозами I00, 300, 500 и I000 Гр (Глеба и др., I987). Эти дозы на один, два порядка превышают ЛД I00, равную для протопластов Nicotiana sylvestris 50 Гр. Гибридизация соматических клеток является, таким образом, своего рода спасительной мерой для генетического материала этих "мертвых" в физиологическом отношении клеток. Практически во

всех проанализированных линиях "гамма"-гибридов, кроме рДНК N. plumbaginifolia, выявлялись также р-повторы облучавшихся родителей. Количество последовательностей рДНК облученного родителя значительно варьировало между разными линиями. Каких-либо закономерностей между степенью амплификации рДНК облучавшихся родителей в геномах гибридных линий и количеством хромосом или дозой гамма-излучения, которыми обрабатывались клетки N. sylvestris и A. belladonna, не выявлено.

Таким образом, показано преимущественное сохранение в геномах "гамма"-гибридов рДНК облучавшихся родителей, по сравнению с другими ядерными маркерами, изоформами ряда ферментов, малой субъединицы рибулозодифосфаткарбоксилазы, а также ДНК органелл (Глеба и др., I987).

ВЫВОДЫ

I. Построены рестриктные карты генов кодирующих рибосомальную РНК пяти видов семейства пасленовых и двух видов семейства крестоцветных. Показана специфичная для каждого семейства локализация сайтов рестриктазы EcoRI в кодирующих последовательностях рДНК.

2. Показано, что рибосомные повторы исследованных видов пасленовых достаточно дивергенны по длине, благодаря варьированию длины нетранскрибируемых спейсеров, разделяющих кодирующие последовательности.

3. Последовательности рДНК могут быть использованы в качестве маркеров ядерных геномов родительских видов как при близкородственной так и при отдаленной гибридизации растений.

4. При межвидовой соматической гибридизации рДНК наследуется двуродительски, как сумма рибосомальных генов обоих родителей.

5. В геномах отдаленных гибридов происходят значительные перестройки последовательностей рДНК:

а) в межтрибном гибриде Arabidobrassica, несущем полный набор хромосом арабидопсиса и лишь несколько хромосом турнепса показано наследование рибосомных повторов арабидопсиса и лишь одного из двух классов р-повторов турнепса;

б) в нескольких линиях гибридов Nicotiana + Atropa обнаружена значительная деамплификация рибосомальной ДНК.

6. Впервые обнаружен факт образования новых классов повторов рДНК в процессе соматической гибридизации растений.

7. В асимметрических гибридах, полученных в результате слия-

ния протопластов N. plumbaginifolia с облученными (дозы I00, 300, 500 и I000Гр) клетками N. sylvestris и A. belladonna, кроме генов рибосомной РНК N. plumbaginifolia, почти в I00% случаев обнаруживается рДНК облучавшихся родителей.

8. Соматические гибриды могут быть использованы в качестве модельной системы при исследованиях молекулярных механизмов эволюционирования геномов.

Основные положения диссертации опубликованы в следующих работах:

I. Мирошниченко Г.П., Волков Р.А., Борисюк Н.В. Структура генома турнепса, арабидопсиса и их соматического гибрида // Биохимия. - I986. - 5I,№I. - С. 84-94.

2. Борисюк Н.В., Волков Р.А., Мирошниченко Г.П. Полинуклеотидные последовательности ДНК пасленовых при половой и соматической гибридизации / Молекулярные механизмы генетических процессов: Тез.докл. УI Всес. симпозиума. Москва, февраль I987 г. - Москва: I987. - С. II2-II3.

3. Мирошниченко Г.П., Волков Р.А., Борисюк Н.В. Организация повторяющихся единиц в генах рРНК пасленовых / Структура и функции клеточного ядра: Тез. докл. Всес. конференции. Черноголовка, май I987 г. - Москва: I987. - С. II8.

4. Борисюк Н.В., Каневский И.В., Глеба Ю.Ю. Наследование и организация рДНК в соматических гибридах Nicotiana tabacum + Atropa belladonna // Доклады АН УССР. Сер. Б. - I987. - № I0. - С. 60-63.

5. Глеба Ю.Ю., Каледа В.А., Пароконный А.С., Борисюк Н.В., Лопато С.В., Негруцу И., Жакобс М. Фертильные ядерные межтрибные гибриды Nicotiana + Atropa, полученные путем слияния нормальной и инактивированной облучением соматических клеток // Доклады АН СССР. - I987. - 297, № 6. - С. I473-I475.

6. Борисюк Н.В., Мирошниченко Г.П. Гены рибосомальных РНК у красавки, Atropa belladonna // Биополимеры и клетка. - I988. - 4, № 2. - С. 79-84.

7. Gleba D., Kaleda V., Parokonny A., Borysjuk N., Gleba Yu., Negrutiu J., Jacobs M. Nuclear genetics of somatic cell hybrids // Abstracts of the XIV International Botanical congress. Berlin (West), Germany, 24 July to 1 August, 1987. Berlin (West), 1987. - P. 154.

Тираж Заказ Объем 5Ф
Подписано к печати

Киев, 110, Клиническая, 25, ВНИС,
ротапринт