

А. Г. СЛЮСАРЕНКО, А. С. АНТОНОВ, академик А. Н. БЕЛОЗЕРСКИЙ

ГОМОЛОГИЧНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕОТИДОВ В ДНК НЕКОТОРЫХ ЛИЛИЕЦВЕТНЫХ

Ранее было показано (¹⁻³), что содержание ГЦ-пар нуклеотидов в ДНК лилиецветных варьирует в широких пределах. Результаты первых опытов по гибридизации ДНК (⁴) также говорили о выраженной специфичности их первичных структур. Эти наблюдения позволили нам предположить (⁵), что некоторые физико-химические характеристики ДНК могут быть использованы в качестве таксономических признаков при уточнении системы высших растений. В частности, мы предложили использовать эти критерии для количественной оценки степени генотипической гомогенности групп видов, образующих таксоны разного ранга. Для этой цели в предыдущих наших работах мы сопоставляем пределы варьирования состава ДНК (мол. % ГЦ) у видов сравниваемых групп (^{2, 5}). В настоящей работе приведены результаты аналогичного сопоставления, выполненного методом молекулярной гибридизации ДНК. Основное внимание мы уделили изучению видов, относимых к родам *Lilium* и *Allium* и их взаимосвязи как с другими родами *Liliaceae*, так и другими семействами и порядками лилиецветных. В качестве «реперных» видов были взяты *A. magu* и *L. martagon*.

Листья исследуемых растений фиксировали и тщательно измельчали в жидком азоте. Клетки лизировали 30 мин. при 60° в растворе, содержащем: 0,15 *M* NaCl + 0,015 *M* цитрат натрия + 0,1 *M* ЭДТА + 0,05 *M* имидазол + 0,1% тритона X-100 + 0,1% твина-80 или твина-60 + 0,3% додецилсульфата натрия (ДСН, рН 8,2—8,6. К лизату добавляли NaCl (или NaClO₄) до конечной концентрации 1—2 мол/л и ДСН — до 1%, а затем после тщательного перемешивания — равный объем смеси хлороформа — *n*-октилового спирта (10 : 1). Смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 5—10 мин., после чего центрифугировали 1 час 4000 об/мин, 4°. Из верхней водной фазы ДНК осаждали, выливая раствор в равный объем охлажденного этанола. Всплывшую «медузу» ДНК растворяли в небольшом объеме воды, доводили концентрацию солей до стандартной (с.р.): 0,15 *M* NaCl + 0,015 *M* цитрат натрия, рН 7,0—7,2, и обрабатывали рибонуклеазой (50 мкг/мл, 37°, 1 час; РНКазу предварительно прогревали 20 мин., 80°). После ферментативной обработки концентрацию NaCl доводили до 1—2 *M* и приливали равный объем хлороформ-октаноловой смеси, встряхивали 5—10 мин. и центрифугировали как описано выше: ДНК осаждали этанолом, промывали 70% этанолом и растворяли в 0,5 *M* NaCl, содержащем 0,001 *M* ЭДТА, рН 5,8—6,2. ДНК из раствора осаждали цетилтриметиламмонийбромидом (ЦТАБ), добавляя по каплям 10% раствор ЦТАБ в 0,5 *M* NaCl (30°) при постоянном перемешивании до конечной концентрации ЦТАБ 0,7—1%. Осадок ДНК собирали центрифугированием (200 об/мин, 10 мин., 25°), промывали 0,5 *M* NaCl и растворяли в 1—2 *M* NaCl, затем осаждали двумя объемами этанола; ДНК растворяли в с. р и осаждали этанолом. Препараты ДНК хранили при 4° под 70% этанолом, рН 7. Дополнительную очистку, при необходимости, проводили по Кирби (⁶) или иными методами (⁷⁻¹⁰).

Гомологии первичных структур ДНК в классе Liliatae, полученные методом гибридизации на мембранных фильтрах

Сравнимый вид	Реперный вид Allium moly	Реперный вид Lilium martagon	Сравнимый вид	Реперный вид Allium moly	Реперный вид Lilium martagon
Liliaceae					
Allium aflatunense	69,5±4,2	11,3±2,3	L. nepalense	14,3±2,9	20,0±1,1
A. altaicum	79,5±4,3	17,4±1,7	L. pardalinum	16,3±1,9	29,9±3,3
A. altissimum	65,5±2,4	22,4±1,2	L. regale	15,9±1,7	64,1±2,7
A. amphylobium	69,2±5,9	10,7±1,3	L. szovitsianum	15,7±1,8	58,1±2,7
A. cepa	85,0±1,6	10,3±3,2	L. tigrinum	15,2±1,3	64,0±5,4
A. christophii	64,3±2,8	17,2±1,8	L. wallichianum	16,7±1,5	19,8±3,1
A. drepanophyllum	76,3±4,2	19,4±2,3	Tulipa fosteriana	11,7±1,4	42,1±0,7
A. karataviense	76,2±1,2	24,3±2,5	T. kaufmanniana	31,2±2,3	30,4±4,1
A. moly	100,0±1,1	14,1±1,1	T. tschimganica	7,5±3,3	28,4±1,5
A. porrum	78,5±4,7	17,3±1,4	Alismaceae		
A. victorialis	73,8±3,4	10,1±3,2	Alisma plantago-aquatica	20,3±2,0	19,1±2,4
A. victorialis var. carpatica	74,5±4,2	24,9±3,3	Iridaceae		
A. ursinum	75,4±4,7	21,0±2,3	Juno vicaria	9,8±2,4	10,1±1,6
A. winklerianum	73,2±5,8	15,7±2,4	Cyperaceae		
Cardiocrinum glehnii	10,7±2,3	36,5±3,2	Cyperus alternifolius	18,9±1,6	17,7±2,2
Gagea lutea	36,0±2,8	10,7±2,5	Commelinaceae		
Haemantus catharinae	19,1±1,7	17,2±1,3	Pyrrhema loddigesii	9,8±2,3	10,2±1,6
Hemerocallis middendorffii	15,5±2,2	9,5±0,9	Araceae		
Hyppeastrum aulicum	23,5±2,1	17,0±1,6	Phellodendron selloum	11,3±3,4	21,6±1,1
Korolkowia sewerzowii	14,2±1,4	23,1±3,3	Orchidaceae		
Lilium amabile	15,0±1,9	59,2±2,7	Anacamptis pyramidalis	26,1±1,4	21,5±3,6
L. candidum	13,2±1,4	46,6±3,4	Comeria taurica	11,0±1,3	13,7±2,7
L. caucasicum	16,4±1,7	79,3±1,3	Listera ovata	15,5±2,5	14,7±1,3
L. dahuricum	18,1±2,3	18,2±2,3	Neottia nidus-avis	16,7±2,3	17,5±0,4
L. distichum	18,6±2,7	93,0±1,3	Platanthera bifolia	15,4±1,7	18,2±2,1
L. kesselringianum	19,5±2,3	61,2±4,2	Aves		
L. kosa	15,6±2,1	59,1±2,3	Gallus domestica	2,3±1,4	2,1±1,3
L. ledebouri	18,5±1,7	38,4±5,2			
L. martagon	15,7±2,1	100,0±2,3			
L. maximoviczii	15,4±2,2	61,7±4,6			
L. monadelphum	11,7±1,7	57,2±1,2			

Гибридизацию ДНК вели двумя методами: на нитроцеллюлозных фильтрах (¹¹⁻¹³) и в растворе (¹⁴). Перед нанесением на фильтры «NAWR Millipore» диаметром 3,5 см путем фильтрования ДНК денатурировали 10 мин., при 60° NaOH (0,001 M), pH 12. ДНК осаждали на фильтры из 6 × с.р., содержащего 0,003 M MgCl₂. Из большого фильтра высекали малые, диаметром 0,5 см, сушили 12 час. при комнатной температуре, а затем 3 часа под вакуумом при 60°. Количество ДНК, осевшей на фильтр, определяли по Спирину (¹⁵). Обычно на малый фильтр удавалось нанести 15—30 мкг ДНК. Препараты меченых ДНК получали методом гриппевого обмена (¹⁶), фрагменты — фенольным методом Кирби (¹⁷). Удельная радиоактивность препаратов фрагментов составляла 7000—8000 имп/мин на 1 мкг ДНК, молекулярный вес их ≈ 2 · 10⁵. Для гибридизации в один флакон помещали 15—20 малых фильтров и добавляли 2 мл раствора H³-ДНК в 2 × с.р., содержащего 2—4 мкг меченой ДНК, инкубировали при 62° в течение 20 час. (C₀t ≈ 0,5). Соотношение меченой и немеченой ДНК в инкубационной смеси составляло около 1:200.

Согласно полученным ранее результатам анализа кинетики реассоциации ДНК некоторых лилиецветных (¹⁸), при этих условиях в реакцию вступает около 30% их ДНК, в основном так называемая фракция

повторяющихся последовательностей нуклеотидов. По окончании инкубации фильтры пятикратно промывали при 62° 10 мл 2×с.р., а затем 0,003 М трис-буфером, рН 9,4 (19), для удаления неспецифически сорбированных фрагментов. Фильтры сушили при комнатной температуре в течение ночи. Определение радиоактивности проводили при помощи счетчика Abac SL-40 К фирмы «Interteknique» в течение 10 мин. при 4°. Использовали толуольный сцинтиллятор.

Опыты по гибридизации ДНК в растворе проводили по прописи авторов метода (20).

Таблица 2

Гомологии первичных структур ДНК луков, полученные методом гидридизации ДНК—ДНК в растворе

Сравниваемый вид	Реперный вид <i>Allium sera</i>	Реперный вид <i>Allium porrum</i>	Сравниваемый вид	Реперный вид <i>Allium sera</i>	Реперный вид <i>Allium porrum</i>
<i>Allium sera</i>	100,0±1,4	64,0±2,4	<i>A. porrum</i>	64,0±2,4	100,0±1,7
<i>A. coeruleum</i>	68,0±1,6	65,0±2,3	<i>A. sativum</i>	67,0±1,3	84,0±1,4
<i>A. karataviense</i>	58,0±2,3	54,0±2,7	<i>A. schoenoprasum</i>	77,0±2,1	63,0±0,9
<i>A. longicauspis</i>	58,0±1,4	73,0±1,7	<i>Lilium martagon</i>	11,0±1,3	16,0±1,4
<i>A. oreophyllum</i>	56,0±0,7	51,0±1,4			
<i>A. oschaninii</i>	80,0±1,5	72,0±1,3			

Результаты опытов представлены в табл. 1 и 2. Из этих данных следует, что ДНК изучаемой фракции у всех изученных видов луков имеет не менее 60% гомологичных последовательностей нуклеотидов, что согласуется с полученными ранее результатами (3). Таким образом, эти виды рода *Allium* образуют генотипически гомогенную группу. В отличие от луков, ДНК видов, составляющих род *Lilium*, иногда содержат заметно меньшее количество таких общих, сходных последовательностей нуклеотидов (в отдельных случаях около 20%). С нашей точки зрения, эти данные говорят о гораздо более выраженной генотипической гетерогенности этого рода. Аналогичный вывод следует также из данных о нуклеотидном составе видов рода *Lilium*, который варьирует в более широких пределах по сравнению с нуклеотидным составом ДНК видов рода *Allium*. Количество гомологичных последовательностей нуклеотидов, обнаруживаемых при гибридизации некоторых видов линий, вполне сопоставимо с результатами гибридизации ДНК *L. martagon* с ДНК видов, относимых к другим родам класса *Liliatae*.

Как и следовало ожидать, исходя из ранее полученных данных (3), ДНК видов, относимых к другим порядкам однодольных (*Iridales*, *Orchidales*, *Poales* и др.), содержат мало нуклеотидных последовательностей, гомологичных ДНК *A. moly* и *L. martagon* (10—20%). Доля таких последовательностей, обнаруживаемых в их ДНК при сравнении с ДНК обоих реперных видов, обычно сходна. Это говорит о том, что скорость изменения первичных структур ДНК в ходе дивергентной эволюции сравниваемых групп была сходной. Исследованная фракция нуклеотидных последовательностей в ДНК лилиецветных в ходе эволюции, видимо, изменялась значительно медленнее других, ответственных за возникновение видоспецифических признаков.

Итак, представленные в этой и ранее опубликованных работах (2-5) результаты говорят о неодинаковой степени генотипического подобия изученных групп видов, относимых систематиками к двум родам — *Allium* и *Lilium*. О чем могут говорить эти различия?

Полученные нами данные, видимо, имеют самое непосредственное отношение к проблеме эквивалентности распределения по рангам в родственных таксонах. Она актуальна как в систематике высших растений, так и других групп организмов. Уместно вспомнить, что Кроусон (21)

предлагал для этой цели избирать некий эталонный таксон и сравнивать с ним прочие при выборе ранга категории. В качестве одного из важнейших объективных количественных критериев, необходимых для таких сопоставлений, безусловно могут быть использованы результаты анализа степени сходства первичных структур ДНК.

Создается впечатление, что род *Allium* является вполне удачным кандидатом на роль такого эталонного рода у однодольных, так как он образован группой как фенотипически, так и генотипически сходных видов. В отличие от луков, род *Lilium* в его современном объеме, видимо, соответствует конгломерату таксонов родового ранга.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
1 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. С. Турицева, Е. И. Маринова и др., ДАН, 183, 1445 (1968). ² Е. И. Маринова, А. С. Антонов, А. Н. Белозерский, ДАН, 184, 483 (1969). ³ А. Г. Слюсаренко, Л. С. Попов и др., ДАН, 205, 727 (1972). ⁴ Е. И. Маринова, Н. С. Владыченская, А. С. Антонов, ДАН, 185, 945 (1969). ⁵ А. С. Антонов, Г. П. Мирошниченко, А. С. Слюсаренко, Усп. совр. биол., 67 (1972). ⁶ K. S. Kirby, E. A. Cook, Biochem. J., 104, 254 (1967). ⁷ N. Sueoka, J. Hardy, Arch. Biochem. and Biophys., 125, 558 (1968). ⁸ P.-A. Albertsson, Biochim. et biophys. acta, 134, 37 (1965). ⁹ S. Rudin, P.-A. Albertsson, Biochim. et biophys. acta, 103, 1 (1967). ¹⁰ R. B. Church, O. J. McCarthy, Biochem. Genetics, 2, 55 (1968). ¹¹ D. Gillespie, S. Spiegelman, J. Mol. Biol., 12, 829 (1965). ¹² D. T. Denhardt, Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 641 (1966). ¹³ S. O. Warpaar, J. A. Cohen, ibid., 24, 554 (1966). ¹⁴ J. De Ley, H. Cattoir, A. Reynaerts, Europ. J. Biochem., 12, 133 (1970). ¹⁵ А. С. Спирин, Биохимия, 23, 656 (1958). ¹⁶ D. G. Searcy, Biochim. et biophys. acta, 166, 360 (1968). ¹⁷ K. S. Kirby, Methods Enzymology, XII, Nucleic Acids, N. Y.—London, 1968, p. B87. ¹⁸ А. С. Антонов, Г. П. Мирошниченко, К. Вальехо-Роман, ДАН, 205, № 5 (1972). ¹⁹ J. De Ley, R. Tijtgat, Antonie van Leeuwenhoek, 36, 461 (1970). ²⁰ R. A. Crowson, Darwin and Classification, Cambridge, Mass., 1958.