

УДК 577.11

БИОХИМИЯ

Г. П. МИРОШНИЧЕНКО, К. М. ВАЛЬЕХО-РОМАН, А. С. АНТОНОВ

КИНЕТИКА РЕАССОЦИАЦИИ ДНК ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА LILIATAE

(Представлено академиком А. С. Спириным 24 X 1973)

Исследованиями последних лет при изучении кинетики реассоциации ДНК установлены некоторые общие принципы организации генетического материала различных организмов, в частности внутренняя гетерогенность ДНК эукариот (¹⁻⁹). Часть ДНК эукариот состоит из повторяющихся последовательностей нуклеотидов, образующих группы с разной численностью членов. Остальная часть генома — это так называемые «уникальные» последовательности нуклеотидов, представленные в виде единичных копий. Сравнительные исследования распределения нуклеотидных последовательностей в ДНК различных организмов весьма ценны для анализа строения геномов на молекулярном уровне. Их результаты могут быть полезны как для выяснения механизмов эволюции геномов, так и для понимания функциональной роли отдельных фракций ДНК. Поскольку таких данных, касающихся высших растений, явно недостаточно (^{5, 8}), нами была предпринята попытка систематического исследования степени внутренней гомологии и гетерогенности ДНК однодольных растений. Для этого был избран метод изучения кинетики реассоциации их фрагментированных денатурированных ДНК (^{1, 8}). Фракции ДНК с разной степенью повторяемости нуклеотидных последовательностей после денатурации реассоциируют с неодинаковой скоростью (¹). На основании анализа кривых кинетики реассоциации ДНК можно судить об относительной доле этих фракций в изучаемых ДНК и о степени повторяемости отдельных участков, т. е. оценить уровень внутренней гомологии изучаемых геномов. Настоящая работа является частью этих исследований и посвящена сравнительному анализу кинетики реассоциации ДНК двух видов лилейных (ландыш, *Convallaria majalis*, и майник, *Majanthemum bifolium*) и трех видов орхидей (ятрышник пятнистый, *Orchis maculata*, любка двулистная, *Platanthera bifolia*, и анакампис, *Anacamptis pyramidalis*).

Препараты ДНК получали из свежего растительного материала методами, описанными ранее (^{10, 11}), и деградировали в растворе ультразвуком (⁸). Для изучения кинетики реассоциации фрагментированных денатурированных ДНК пользовались оптическим методом (^{1, 8}). Кинетику процесса реассоциации ДНК описывали в системе координат, предложенной Бриттеном и Коном (¹). По оси ординат откладывали долю реассоциировавшей ДНК (в %), а по оси абсцисс — величину C_0t , представляющую собой произведение начальной концентрации фрагментов ДНК C_0 (в молях нуклеотидов на литр), на время протекания процесса реассоциации t (в секундах). На рис. 1 приведены кинетические кривые, характеризующие процесс реассоциации ДНК изученных однодольных растений и кишечной палочки. Кривые построены на основании анализа экспериментальных данных на вычислительной машине БЭСМ-3М по методу наименьших квадратов (¹²). Для сравнения даны также кривые, полученные ранее оптическим методом для пшеницы (⁷) и методом хроматографии на гидроксипатите для ДНК лука (⁸) и приведенные путем расчетов к условиям реассоциации, использованным в настоящей работе. Как видно из

рис. 1, все кривые, отражающие кинетику реассоциации ДНК изученных растений, отличаются от кривых реакции 2-го порядка, характеризующих простые геномы прокариот, не содержащие заметных фракций повторяющихся последовательностей. Это подтверждает полученные ранее данные о внутренней гетерогенности генетического материала высших растений (⁵⁻⁸). В ДНК всех изученных нами однодольных растений существует фракция, реассоциирующая практически мгновенно, так что за ее реассоциацией невозможно проследить выбранным нами методом. Поскольку скорость реассоциации ДНК прямо пропорциональна частоте встречаемости

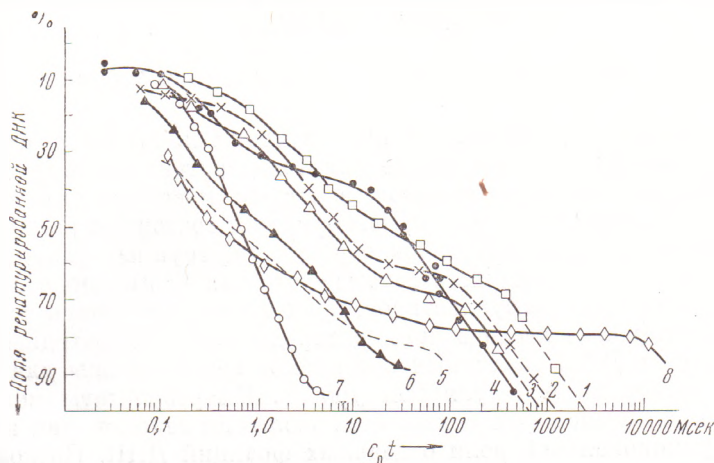


Рис. 1. Кинетика реассоциации ДНК. 1 — майник (*Majanthemum bifolium*), 2 — лавдаш (*Convallaria majalis*), 3 — анакамптис (*Anacamptis pyramidalis*), 4 — лук (*Allium cepa*), 5 — ятрышник (*Orchis maculata*), 6 — любка двулистная (*Platanthera bifolia*), 7 — кишечная палочка (*Escherichia coli*), 8 — пшеница (*Triticum vulgare*)

в ДНК данной нуклеотидной последовательности, очевидно, что наиболее быстро реассоциирующая фракция ДНК состоит из последовательностей нуклеотидов с наибольшей степенью повторяемости. Эта фракция, как видно из рис. 1, составляет около 10% всех ДНК, а у любки и ятрышника достигает 20–30%. Как показано (⁷), значительная доля очень быстро реассоциирующей фракции характерна также для генома злаков (рис. 1, 8). Наиболее медленно реассоциирующая фракция ДНК представляет собой наиболее редко встречающиеся, «уникальные» последовательности нуклеотидов. Эта фракция в ДНК изученных нами лилейных и орхидей сравнительно невелика и составляет 10–40%, что сближает эти ДНК с ДНК злаков (⁷). В то же время ранее было показано, что у большинства исследованных видов луков (⁸) доля «уникальных» последовательностей несколько выше (40–60% от всей ДНК). Это может свидетельствовать о существовании — наряду с общими признаками — определенных различий в организации геномного материала высших растений. В связи с наличием обратной пропорциональной зависимости между скоростью реассоциации ДНК и размером генома (⁷), на основании анализа полученных нами кинетических кривых можно сделать заключение о том, что наибольшим размером генома из исследованных в настоящей работе однодольных растений обладает майник. Изученные нами виды орхидей в целом обладают геномом меньшего размера, чем представители других семейств однодольных растений. Создается впечатление об определенной связи уменьшения размеров генома с прогрессивной эволюцией в направлении развития энтомофилии у орхидей. При рассмотрении представленных на рис. 1 кривых видно, что основную часть изученных ДНК (60–90%) составляет фракция повторяю-

щихся последовательностей. Она включает как наиболее быстро реассоциирующие последовательности нуклеотидов с наивысшей степенью повторяемости, так и участки генома, реассоциирующие с промежуточной скоростью и характеризующиеся, следовательно, несколько более низкой частотой встречаемости отдельных элементарных единиц. Следует отметить, что процесс реассоциации повторяющихся последовательностей различается меньше, чем реассоциация «уникальных» последовательностей: при значениях $C_0t=0,1-10$ кинетические кривые практически параллельны друг другу. Наклон кривых кинетики реассоциации ДНК характеризует степень повторяемости нуклеотидных последовательностей ⁽¹⁾. Поэтому мы, очевидно, вправе сделать заключение о том, что геномы изученных однодольных растений близки друг к другу по степени повторяемости отдельных элементарных единиц. При этом доля фракций с той или иной степенью повторяемости в этих ДНК несколько отличается, поскольку кинетические кривые лежат на разном уровне. Наиболее высокое содержание повторяющихся последовательностей (80—90%) наблюдается у любки и ятрышника. Как было показано ранее ⁽⁷⁾, сходным геномом обладают злаки. Создается впечатление, что прогрессивная эволюция в этих двух группах однодольных растений, направленная в сторону развития энтомофилии у орхидей и в сторону анемофилии у злаков, может сопровождаться значительным повышением доли повторяющихся последовательностей в геномах. Следует отметить, что доля повторяющихся последовательностей в геномах изученных нами лилейных варьирует меньше, чем доля «уникальных» последовательностей.

Таким образом, на основании анализа представленных кривых кинетики реассоциации ДНК можно сделать некоторые заключения о строении генного материала исследованных однодольных растений. Для изученных геномов характерна внутренняя гетерогенность, выражающаяся в наличии фракций с различной степенью повторяемости. Вместе с тем наблюдается весьма значительное содержание повторяющихся последовательностей, т. е. изученные геномы отличаются высокой степенью внутренней гомологии, что было показано и для других высших растений ^(6-8, 13). В ДНК животных повторяющиеся последовательности нуклеотидов составляют 10—50% ^(1, 14, 15), т. е. их доля ниже, чем у высших растений. Видимо, повышение степени внутренней гомологии в геномах высших растений отражает особенности механизма их эволюции.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
8 X 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. J. Britten, D. E. Kohne, Carnegie Inst. Year Book, 1965—1966, № 65, 78 (1967).
- ² J. R. Brown, R. B. Church, Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 5 (1971).
- ³ W. Hennig, R. M. B. Walker, Nature, 225, 915 (1970).
- ⁴ G. F. Saunders et al., Mol. Biol., 63, 323 (1972).
- ⁵ Е. И. Маринова, А. С. Антонов, А. Н. Белозерский, ДАН, 184, № 2, 483 (1969).
- ⁶ D. G. Searcy, A. F. McInnis, Evolution, 24, 796 (1970).
- ⁷ A. J. Bendich, B. J. McCarthy, Genetics, 65, 545 (1970).
- ⁸ Г. П. Мирошниченко, А. С. Антонов, К. М. Вальехо-Роман, ДАН, 205, № 5, 1243 (1972).
- ⁹ Н. С. Владыченская, А. С. Антонов, Сборн. Строение ДНК и положение организмов в системе, М., 1971.
- ¹⁰ J. Marmur, J. Mol. Biol., 3, 708 (1961).
- ¹¹ А. Г. Слюсаренко, Сборн. ДНК и положение организмов в системе, М., 1971.
- ¹² Л. С. Николаева, Программа по регрессионному и конфлюентному анализу (ЭЦВМ БЭСМ-3М, препринт № 9, МГУ), 1960.
- ¹³ Y. M. Sivolar, J. Bonner, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 387 (1971).
- ¹⁴ Ch. D. Laird, B. J. McCarthy, Genetics, 60, 203 (1968).
- ¹⁵ Н. С. Куприянова, М. Я. Тимофеева, Мол. биол., 7, № 1, 140 (1973).