

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук
Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь - бакалавр

на тему «**ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОДУ *GENTIANA* ЗА
ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНІВ рДНК**»

Виконала: студентка 4-го року навчання
спеціальність 091 — біологія
Братчик Богдана Романівна

Керівники:

Андрєєв І.О.,
к.б.н., пр. наук. спів. відділу генетики
клітинних популяцій Інституту
молекулярної біології і генетики НАН
України

Антонюк М.З.,
д.б.н., професор кафедри біології НаУКМА

Рецензент:

Дробик Н.М.,
д.б.н., професор, декан хіміко-
біологічного факультету Тернопільського
національного педагогічного університету
імені Володимира Гнатюка

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пасічник Т.В.

«____» червня 2020 року

Київ – 2020

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1: ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1: Особливості роду <i>Gentiana</i>	7
1.1.1: Таксономія та поширення в Україні роду <i>Gentiana</i>	7
1.1.2: Фітохімічні/лікувальні властивості роду <i>Gentiana</i>	8
1.2: Генетичні дослідження <i>Gentiana</i> за допомогою ДНК-маркерів	9
1.3: Принципи організації рибосомної ДНК	10
1.4: Варіабельність генів рРНК.....	14
1.5: Варіабельність міжгенного спейсера	16
1.6: Внутрішні транскрибовані спейсери	17
1.7: Філогенетика роду <i>Gentiana</i>	18
РОЗДІЛ 2: ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	20
2.1: Рослинний матеріал	20
2.2: Виділення ДНК зі свіжого і сухого рослинного матеріалу	20
2.3: Електрофорез в агарозному гелі.....	23
2.4: ПЛР з праймерами до 5S рДНК.....	25
2.5: Виділення ампліфікованих фрагментів 5S рДНК з агарозного гелю	25
2.6: Гідроліз фрагментів 5S рДНК ендонуклеазою рестрикції.....	27
2.7: Лігування фрагментів 5S рДНК і плазмиди pUC18	27
2.8: Отримання компетентних клітин <i>Escherichia coli</i>	28
2.9: Трансформація компетентних клітин <i>E.coli</i> рекомбінантною плазмідною	28
2.10: Виділення плазмиди методом лужного лізису	29
2.11: Аналіз послідовностей рДНК	30

РОЗДІЛ 3: РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ .	32
3.1: Аналіз за послідовністю МГС 5S рДНК	33
3.2: Аналіз за геном 5.8S рРНК.....	35
3.3: Аналіз за послідовністю ВТС2	37
3.4: Обговорення результатів.....	38
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	40
ВИСНОВКИ	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	43
ДОДАТКИ.....	47
Додаток А1. Вирівняні послідовності МГС 5S рДНК досліджуваних видів	47
Додаток А2. Вирівняні послідовності гену 5.8S рРНК досліджуваних видів	48
Додаток А3. Вирівняні послідовності ВТС2 досліджуваних видів	49

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВТС	– внутрішній транскрибований спейсер
МГС	– міжгенний спейсер
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
рДНК	– рибосомна ДНК
рРНК	– рибосомна РНК
ТІТ	– точка ініціації транскрипції
ТТТ	– точка термінації транскрипції

ВСТУП

Родина Gentianaceae - третя за величиною родина Gentianales, що налічує близько 1700 видів з великим розмаїттям середовищ існування, морфологією та екологією. Тирлич (*Gentiana* L.) є типовим, найчисленнішим за видовим складом у флорі України родом родини Gentianaceae, і загалом нараховує близько 400 видів [1,2]. Наявність агрегатних видів у межах роду, складність визначення систематичної цінності та ступеня мінливості ознак, відсутність чітких родових меж, що зумовлено особливостями еволюції тирличевих, які утворюють численні паралельні ряди конвергентних форм, ускладнює створення загальновизнаної системи для роду *Gentiana* [2–5]. На сьогодні існує кілька класифікацій роду, в основу яких покладені морфологічні, анатомічні, еколого-географічні, онтогенетичні ознаки (критерії). Проте цих даних не достатньо для створення повної, чітко визначеної систематики роду. Останні кілька десятиліть для вирішення цих питань та уточнення систематики стали використовувати у якості факторів для розподілу організмів різноманітні генетичні маркери, в тому числі й гени рибосомної ДНК [3,4,6–10].

Рибосомна ДНК (рДНК) – це родина генів, які кодують рибосомну РНК (рРНК). Основною функцією рРНК є синтез білків, адже їхні молекули є основними функціональними елементами рибосом [11]. Зважаючи на важливість їх функції, гени рДНК містяться у всіх живих організмах. Особливості структури генів рДНК, такі як багатокопійність, кластерна організація, висока консервативність кодуючих ділянок та мінливість спейсерних послідовностей, а також наявність механізмів, що забезпечують узгоджену еволюцію повторів рДНК всередині кластеру, роблять їх

придатною моделлю для з'ясування проблем екології, популяційної генетики, селекції та систематики [8,9,12].

Об'єктом досліджень були рослини роду *Gentiana*, а предметом досліджень – їхні нуклеотидні послідовності МГС 5S рДНК, ВТС2 та гену 5.8S рРНК.

Метою роботи було отримання клонованих послідовностей міжгенного спейсера 5S рДНК видів роду *Gentiana*, а також дослідження і уточнення філогенетичних зв'язків між представниками роду *Gentiana* за поліморфізмом цієї послідовності а також послідовностями внутрішнього транскрибованого спейсеру 2 та гену 5.8S рДНК.

Завдання:

1. Виділити та отримати клоновані послідовності міжгенного спейсера 5S рДНК із різних видів роду *Gentiana*.
2. Провести порівняльний філогенетичний аналіз видів роду *Gentiana* за поліморфізмом МГС 5S рДНК, ВТС2 та гену 5.8S рРНК.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості роду *Gentiana*

1.1.1. Таксономія та поширення в Україні роду *Gentiana*. *Gentianaceae* - третя за величиною родина *Gentianales*, що налічує близько 1700 видів у 91 роді з великим розмаїттям середовищ існування, морфологією та екологією. Численні види родини *Gentianaceae* мають декоративну цінність, особливо види, що належать до роду *Gentiana*, а також представляють фармацевтичний інтерес завдяки своїм фітохімічним властивостям [13]. Родина *Gentianaceae* у флорі України представлена 6 родами: *Blackstonia* Huds., *Centaurium* Hill, *Gentiana* L., *Gentianella* Moench, *Gentianopsis* Ma Yu-Chuan, *Swertia* L. [1].

Тирлич (*Gentiana* L.) є типовим, найчисленнішим за видовим складом у флорі України родом родини *Gentianaceae* [1,2]. Він нараховує близько 400 видів рослин, що переважно ростуть у гірських регіонах вище 1000 м над рівнем моря.

Відповідно до поділу Но та Liu [5], в межах роду виділяють 15 секцій, 14 з них широко поширені в Азії, 8 в Європі, 6 в Америці, та деякі види присутні також в Африці та Австралії. Секція *Chondrophyllae* розповсюджена на всіх вище перелічених континентах, *Calathianae* відсутня в Австралії, *Pneumonanthe*, *Frigida*, *Dolichocarpa* – в Австралії та Африці; секції *Gentiana* та *Cruciata* присутні у Європі та Азії, а секція *Ciminalis* присутня виключно в Європі [17].

До європейських тирличів належить 27 видів, з них 17 - ендеміки, а решта - широко розповсюджені. В Європі більшість видів зустрічаються в гірських масивах, таких як Альпи, Піренеї та Карпати [1,2].

В Україні рід *Gentiana* представлений 10 видами, з них 8 – багаторічники (*G. acaulis* L., *G. asclepiadea* L., *G. cruciata* L., *G. laciniata* Kit. ex Kanitz, *G. lutea* L., *G. pneumonanthe* L., *G. punctata* L., *G. verna* L.) і 2 – однорічники (*G. nivalis* L., *G. utriculosa* L.). *G. acaulis*, *G. asclepiadea*, *G. laciniata*, *G. lutea*, *G. punctata*, *G. verna*, *G. nivalis* та *G. utriculosa* поширені в межах флористичних районів Українських Карпат. *G. pneumonanthe* росте у всіх ботаніко-географічних районах України, за винятком Криму. *G. cruciata* поширений у південній частині лісових районів, у лісостепових зонах і Криму [2].

Оскільки ці рослини використовуються у виробництві фітопрепаратів, внаслідок антропогенного впливу відбувається скорочення ареалів, зменшення чисельності та порушення структури природних популяцій, що зумовило занесення 7 з 10 видів роду *Gentiana* до «Червоної книги України»: *G. acaulis* L., *G. laciniata* Kit. ex Kanitz, *G. lutea* L., *G. nivalis* L., *G. punctata* L., *G. utriculosa* L., *G. verna* L. [13,14].

1.1.2. Фітохімічні/лікувальні властивості роду *Gentiana*. Ще у давні часи рослини з роду *Gentiana* використовувались у народній медицині. Деякі види тирличів входять у фармакопеї багатьох країн світу. Різні форми препарату рослин ефективні для лікування різноманітних порушень, таких як офтальмія, гематурія, ревматизм, запалення нирок і сечового міхура, укуси отруйних тварин, травми, інфіковані рани, біль та набряк печінки, селезінки, шлунку та розтягнення м'язів [13]. Рослини проявляють протизапальну, гепатопротекторну та сечогінну дію. Було показано, що фармакологічно-активними компонентами є вторинні метаболіти рослин, такі як гентіопікрозид, іридоїди, ксантони, монотерпенові алкалоїди, поліфенол та флавоноїди. Зважаючи на лікувальні властивості рослин з роду *Gentiana*, останні роки проводилось багато досліджень із вивчення тирличів. Зокрема отримано культури *in vitro* для одержання біологічно активних речовин, проведено фітохімічний аналіз компонентів рослин різних видів, а також проведено дослідження деяких ділянок геному і філогенетичних зв'язків [13,15]. Ще

однією проблемою пов'язаною із використанням цих рослин є висока морфологічна подібність близькоспоріднених видів. Це може призвести до використання у створенні лікарських засобів сировини не тих видів, що є небезпечним. Ця проблема може бути вирішеною за допомогою автентифікації із застосуванням підходящих для певних видів ДНК-маркерів [16–22].

1.2. Генетичні дослідження *Gentiana* за допомогою ДНК-маркерів

Молекулярно-генетичні маркери знайшли широке застосування у дослідженні між- та внутрішньовидової різноманітності, ідентифікації, систематиці та філогенетичному аналізі рослин [6,8–10,16–21]. Генетичним маркером називають ген або стандартизовану ділянку ДНК з відомим розташуванням на хромосомі, що здатні розрізняти тісно споріднені види та ідентифікувати нові [16]. Підходящий для автентифікації ДНК-маркер повинен відповідати таким вимогам: висока міжвидова дивергенція; низька внутрішньовидова дивергенція; короткий продукт ПЛР (до 1 т.п.н.); та наявність універсальних праймерів для ампліфікації [9]. Так, наприклад, у тварин для автентифікації видів універсальним ДНК-маркером є мітохондріальна цитохром С оксидаза І (COI), але цей ген не може бути використаним для рослин через повільні темпи розвитку та обмежену міжвидову дивергенцію, тож його використання обмежується лише деякими водоростями [16].

Для дослідження рослин існує багато різноманітних молекулярно-генетичних маркерів: *gbcL*, *matK*, ядерні внутрішні транскрибовані спейсери (BTC) і міжгенний спейсер 5S рДНК (МГС), хлоропластні *trnH-psbA*, *trnL-F*, *gpl36-gps8* міжгенні спейсери, ISSR-маркери та інші [6,8–10,17–22]. Їх можна застосовувати як поодинокі, так і у комбінаціях. BTC виявлений у рослин, тварин та грибів і складається з BTC1 та BTC2. Використання BTC-ділянок

ефективне для філогенетичних досліджень у багатьох родинях покритонасінних. МГС 5S рДНК дуже мінливий і має дещо вищу роздільну здатність, ніж послідовності ВТС. Хлоропластний спейсер *trnH-psbA* придатний для ідентифікації видів, а *trnL-F* є інформативними на загальному рівні [9,16]. У роботі [9] було визначено, що всі сім вищезазначених локусів можна використовувати для диференціювання лікарських видів *Gentiana*. Проте лише при застосуванні міжгенних спейсерів 5S рДНК та *trnL-F* вдалося розрізнити близькоспоріднені види *G. triflora*, *G. scabra* та *G. manshurica* [9].

Особливості структури генів рДНК, а саме множинна кількість копій, кластерна організація, висока консервативність кодуєчих ділянок та мінливість спейсерних послідовностей, а також наявність механізмів, що забезпечують узгоджену еволюцію повторів рДНК всередині кластеру, роблять їх зручною моделлю для з'ясування проблем екології, популяційної генетики, селекції та систематики [8,9,18]. Міжгенні спейсерні ділянки 5S рДНК є найменшими серед інших послідовностей (від 200 до 500 п.н.), і при цьому вони мають найбільшу мінливість, що дозволяє розрізнити близькоспоріднені види [9].

1.3. Принципи організації рибосомної ДНК

Рибосомна ДНК (рДНК) – це родина генів, які кодують рибосомну РНК (рРНК). У рослинах рДНК знаходиться у ядерних, мітохондріальних та хлоропластних геномах. Основною функцією рРНК є синтез білків, адже їх молекули є основними функціональними елементами рибосом [11]. Зважаючи на важливість їх функції, гени рРНК містяться у всіх живих організмах, що дозволяє використовувати їх для філогенетичних досліджень та систематики.

Гени рРНК характеризуються кластерною організацією та великою кількістю тандемних повторів. Кількість копій в геномі рослин може варіювати від 500 до 30 000 одиниць. У рослин є два типи кластерів рДНК, це

35S рДНК і 5S рДНК. Кожна структурна одиниця 35S рДНК включає висококонсервативні кодуючі ділянки – гени 5.8S, 18S, 25S рРНК та внутрішні транскрибовані спейсери (ВТС). У прокаріотів та деяких нижчих еукаріотів ген 5S рРНК також входить до 35S кластерних одиниць/рибосомних повторів (L-тип організації рДНК, linked), але у вищих еукаріотів вони формують кластери окремо від інших рибосомних генів (S-тип організації рДНК, separated) [8,11,12,23,24]. Області кодування сусідніх рибосомних повторів розділені нетранскрипційним або міжгенним спейсером (МГС). Схематична будова рДНК зображена на рис.1.1.

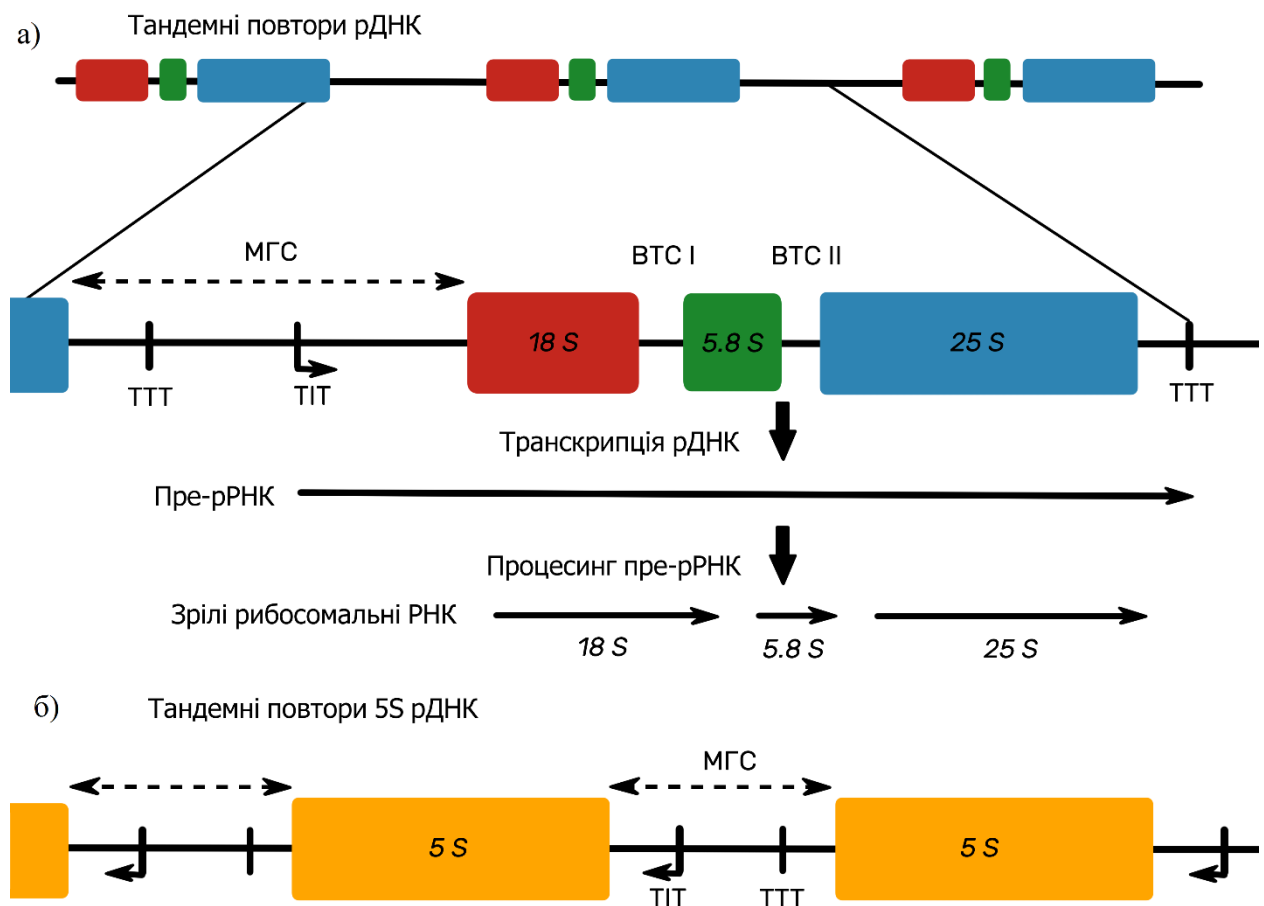


Рис.1.1. Схематичне зображення організації рДНК: а – 35S кластер, б – 5S кластер; МГС – міжгенний спейсер, ВТС – внутрішній транскрибований спейсер, ТІТ – точка ініціації транскрипції, ТТТ- точка термінації транскрипції.

Особливість 5S рДНК полягає в тому, що вона транскрибується РНК-полімеразою III в протилежному напрямку у порівнянні з іншими рДНК генами, коли інші рДНК – РНК-полімеразою I [12,23].

Цитогенетичні характеристики розташування 5S та 35S рДНК кластерів було детально вивчено та описано у роботі [24]. Було показано, що майже третина від проаналізованих каріотипів (всього 2494) мала щонайменше одну хромосому, яка містила обидва рДНК кластери одночасно, і у 73% випадків вони розташовувались на одному плечі хромосоми. На хромосомі локуси 35S рДНК знаходяться, переважно, термінально, що особливо виражено у видів з L-типовою структурою рДНК та у видів з одиничним локусом 35S рДНК. Локуси 5S рДНК переважно інтерстиціальні або центромерні, що є найбільш очевидним у видів з одним локусом. Однак термінальне розміщення 35S рДНК або інтерстиціальне/центромерне для 5S рДНК не є важливими для їх функціональності, оскільки доволі часто зустрічаються види з лише одним локусом, що розташовується в інших місцях хромосоми [24].

Потенційно взаємозв'язок між розміром геному та локусовим числом відображає накопичення повторів, включаючи рДНК. Тобто зі збільшенням геному відбувається збільшення кількості повторів. Однак є кілька винятків із цієї тенденції. Наприклад, види з малими геномами можуть мати до восьми локусів 35S, тоді як певні види з великими геномами мають лише два локуси 35S. Змішане положення 5S та 35S рДНК може бути пов'язаним з великою кількістю локусів у каріотипі [24].

Як відомо, гени рРНК у ядерному геномі рослини знаходяться у надлишковій кількості [11,25]. Велика кількість рДНК лежить у гетерохроматичній області хромосоми, яка не підлягає транскрипції [26–28]. Ті гени рРНК, які транскрибуються, лежать в області ядерцевого організатора хромосоми та на метафазних хромосомах утворюють вторинні перетяжки [11]. Локус 5S рДНК, через своє досить часте центромерне положення, більш схильний до гетерохроматизації, ніж локус 35S рДНК [24,26,28].

Процеси гетерохроматизації негативно впливають на експресію генів. Регуляція активності генів відбувається за допомогою метилювання. Приєднання метильних груп до залишків цитозину призводить до зменшення активності транскрипції цих ділянок. Гени в межах ядерцевого організатора підлягають меншому метилюванню, ніж ті, що розташовуються у гетерохроматичній області хромосоми. Було показано, що при видаленні області з високою активністю транскрипції генів рРНК, відбувається зниження рівня метилювання в інших областях, тобто відбувається активація «запасних» центрів експресії рДНК [11]. Потенційно висока транскрипційна активність локусів 35S рДНК може перетворити локус у крихке місце на хромосомі, і, можливо, неміцні ділянки термінальної 35S рДНК менш шкідливі, ніж інтерстиціальні.

Існує кілька механізмів для задоволення величезного попиту на рРНК у різних організмів. У бактерій гени рРНК розташовуються у 7 юнітах (tmA, B, C, D, E, G, та H), кожен з яких має своє окреме положення на хромосомі [23]. Швидкість їх транскрипції може підлаштовуватися так, щоб продукція генів рРНК відповідала швидкості росту клітин. У найпростіших, слизовиків і в ооцитах деяких тварин наявний механізм під назвою екстрахромосомна ампліфікація. В такому випадку з однієї послідовностей рДНК утворюються від сотень до тисяч екстрахромосомних копій, які можуть транскрибуватись окремо від оригінальної послідовності. Також збільшувати кількість генів можна за рахунок реплікації всього геному додатковими раундами реплікації ДНК без поділу клітин для створення поліплоїдних або політенних хромосом. Цей метод застосовується для збільшення кількості копій всіх ядерних генів, а не тільки генів рРНК, хоча цілком ймовірно, що додаткова рДНК також використовується для збільшення продукції рРНК. Четвертий механізм задоволення підвищеної потреби в генних продуктах – утворення великої кількості генів рРНК у вигляді тандемних повторів – характерний для еукаріотів, включаючи рослини [11].

Окрім відмінності механізмів для задоволення попиту на рРНК, різні організми мають різну організацію рДНК (рис.1.2). У бактерій гени рРНК формують одиниці з кількох кодуючих ділянок, які розкидані по різних ділянках хромосоми. Більш організованою є будова у дріжджів, у яких близько 100-200 копій послідовностей рДНК розміщуються в одному кластері [23]. У вищих еукаріотів гени рРНК формують кластерні одиниці. Рослини, як правило, мають більше генів рРНК, ніж інші групи організмів.

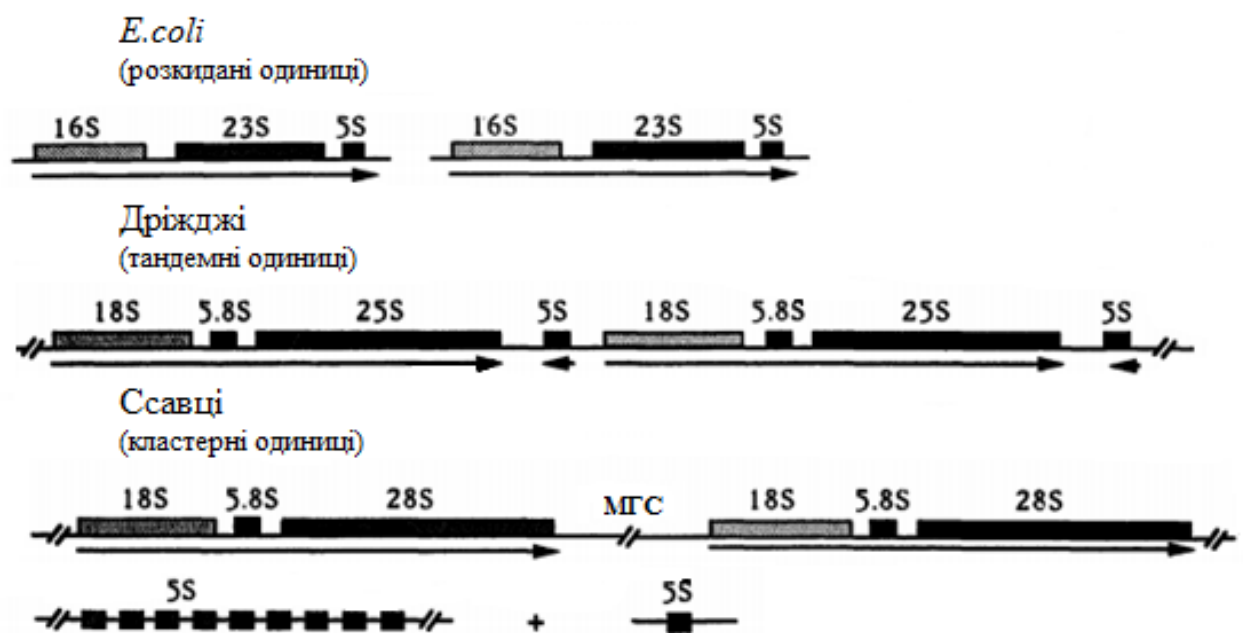


Рис. 1.2. Організація генів рРНК у різних організмів. Адаптовано з [23].

1.4. Варіабельність генів рРНК

Найбільшою особливістю рДНК є висока консервативність кодуючих послідовностей, які в межах кожного виду зберігаються однаковими, у той час як МГС є найбільш варіабельною ділянкою генів рДНК. Цей мотив висококонсервованих кодуючих областей та мінливих міжгенних спейсерів з видоспецифічними мутаціями виявлений у рДНК усіх досліджуваних видів. Ця закономірність внутрішньовидової однорідності та міжвидової

гетерогенності підтримується горизонтальною еволюцією та випадковою еволюцією, які у поєднанні називають узгодженою еволюцією (concerted evolution) [11,25].

Узгоджена еволюція полягає у рівномірній зміні генів: якщо відбувається мутація в одному з кластерів, то ці зміни відбуваються і в усіх інших кластерах/копіях. Механізми узгодженої еволюції це насамперед нерівний кросинговер або нерівний обмін та конверсія генів [11]. Для досягнення загальної гомогенності один або обидва ці процеси повинні відбуватися в кожному окремому локусі, між локусами рДНК на гомологічних хромосомах та між локусами рДНК на негомологічних хромосомах. Теоретично перетворення гену може протікати в будь-якому напрямку, коли розпізнається гетеродуплекс, тобто мутант може бути перетворений в дикий тип або навпаки [11].

Ще одною формою варіабельності рДНК є різна кількість копій генів у геномі. У рослин варіації кількості генів існують як на міжвидовому, так і на внутрішньовидовому рівнях [11]. Велика кількість повторів з'явилась для забезпечення клітини достатньою кількістю рибосом, адже один ген рРНК не може транскрибуватись достатньо швидко [23]. Також була висловлена ідея, що у визначенні кількості копій рДНК могли відігравати роль фактори навколишнього середовища, і збільшення кількості генів було відповіддю на стресові умови [25].

Зміни кількості копій генів та мінливість відбуваються завдяки рекомбінаційним подіям, які призводять до адекватно великого пулу рДНК. Проте було показано, що кількість генів рРНК перевищує необхідну для отримання достатньої кількості рРНК [25]. У цьому відношенні рДНК не сильно відрізняється від більшості інших ДНК рослинних ядер, мітохондрій та хлоропластів, які, як вважається, перевищують кількість, необхідну для нормального функціонування організму. Разом з тим, було показано, що є мінімальний необхідний рівень кількості рДНК [11]. При кількості генів

меншої за цю межу відбуваються дегенеративні порушення функцій організму, але перевищенні – помітного впливу на фенотип не має.

Також було виявлено, що серед різних тканин однієї рослини може знаходитись різна кількість копій генів рРНК. Це явище пояснюється тим, що обмін ділянками відбувається під час мітотичного, а також мейотичного поділів клітинного циклу [25].

1.5.Варіабельність міжгенного спейсера

Головні відмінності між видами пов'язані з частиною МГС, яка знаходиться між консервативними сайтами. У МГС 5S рДНК містяться послідовності, необхідні для роботи РНК-полімерази III, а саме - точки ініціації (TIT) та термінації транскрипції (TTT), а також зовнішні елементи промотора, що представлені А+Т насиченою зоною, що співпадає з TIT, та G/C бокс [8,11,12,23,25,29]. Функцію термінатора транскрипції для РНК-полімерази III еукаріотів виконує оліго-дТ мотив, що безпосередньо межує з 3'-кінцем кодувальної ділянки 5S рДНК [3,12,29]. А+Т насичена зона окрім ініціації реплікації та впливу на транскрипцію рДНК, приймає участь ще й у регуляції кількості копій (ампліфікації) послідовностей рДНК [3,12,29]. МГС причетний до нуклеолярного домінування, явищі, при якому один клас рРНК транскрибується, а інший – ні [25].

Поліморфізм міжгенного спейсера пов'язаний із відсутністю такого жорсткого селективного тиску, як на транскрибовані кодуючі ділянки. Молекулярною основою гетерогенності МГС є різниця у кількості субповторів – коротких повторюваних елементів довжиною 20–300 п.н., що формують окремі ділянки спейсера, еволюціонують із значною швидкістю за розмірами та структурою і є унікальними для різних видів. Однак не всі види виявляють неоднорідність за довжиною. МГС може виявляти значну різницю довжини в популяціях одного виду, у особин популяції і навіть в окремих хромосомних

локусах [11]. Через таку динамічність, саме за ними і досліджують поліморфізм [8,11].

Варіабельність кількості цих субповторів у МГС пояснюється неоднаковим схрещуванням всередині окремої одиниці повтору або між одиницями або на одній і тій же хромосомі, або в її гомолозі [11,25]. Довжина МГС змінюється повільніше, ніж кількість копій гена.

1.6. Внутрішні транскрибовані спейсери

Ділянки BTC1 та BTC2 рДНК розділяють між собою кодуєчі послідовності генів рРНК та знаходяться з двох боків від гену 5.8S рРНК [20,30–34]. Обидва спейсери входять до складу транскрипту пре-рРНК, що відображає їх назва транскрибованих спейсерів, та відіграють певну роль у процесі визрівання рибосоми. Зокрема, BTC2 бере участь у формуванні вторинної структури великої субодиниці рибосоми [31,34].

Як відомо, одноланцюгова РНК здатна до формування вторинних структур, які включають спіралі, утворені спареними гомологічними ділянками, петлі та випинання. Дослідження вторинної структури BTC2 з використанням електронної мікроскопії, хімічного та структурного аналізу, а також сайт-спрямованого мутагенезу дозволило встановити існування деяких універсальних рис вторинної структури цієї ділянки РНК-транскрипту. Зокрема, було визначено, що вона утворює чотири спіралі. У рослин найбільш швидко еволюціонує ділянка спіралі IV, друга після неї за темпами змін – ділянка спіралі I. Значну стабільність має ділянка спіралі II, на якій розташоване піримідин-піримідинове випинання, а найбільш консервативна ділянка, до складу якої входить 20-нуклеотидна послідовність з мотивом TGGT, розташована на 5'-кінці спіралі III [34].

Спіральне кільце, утворюване BTC2, необхідне для правильної просторової орієнтації 5.8S та 25S рРНК та подальшого процесингу преРНК. Зокрема було

показано, що за відсутності або порушенні певних частин цієї кільцевої структури визрівання великої субодиниці рибосоми не відбувалося [34].

ВТС1 еволюціонує з більшою швидкістю і має менше консервативних сайтів порівняно із ВТС2, що пов'язано з різним функціональним значенням цих ділянок РНК-транскрипту у процесі формування зрілої рибосоми. Нечисленні спроби використати порівняльний аналіз структурної організації ділянки ВТС1 для філогенетичного аналізу у рослин, проведені в минулому, виявили, що рівень подібності цих структур недостатній для таких досліджень [17,18,30–32].

1.7. Філогенетика роду *Gentiana*

Було проведено велику кількість філогенетичних досліджень родини Gentianaceae. Визначення філогенетичних зв'язків проводились із використанням рестрикційного аналізу хлоропластної та ядерної ДНК, хлоропластних маркерних послідовностей: інтрон *trnL* (UAA), міжгенні спейсери *trnL-trnF* та *rpl16-rpl14*, кодуєча ділянка *rpl16*, а також ВТС1, ВТС2 [35–39].

У більшості робіт філогенетичні зв'язки між таксонами збігаються з морфологічно визначеними класифікаціями, але часто виникають конфлікти. Так, наприклад, у роботі [39] результати дослідження видів *Gentiana* секції *Cruciata* показали, що всі види цієї секції містять монофілетичну групу, але відхилили всі попередні гіпотези щодо внутрішньосекційних класифікацій на основі морфології. У роботі [38] результати переважно узгоджувались з попередніми філогенетичними та таксономічними дослідженнями, але *G. cachemirica* та *G. yakushimensis* були класифіковані до відмінних від морфологічної класифікації секцій. Філогенія за ВТС в більшості відповідала морфологічній класифікації, за винятком того, що *G. asclepiadea* була тісно пов'язана з секцією *Gentiana* замість секції *Pneumonanthe*, та секція *Stenogyne*,

виявилась парафілетичною групою роду *Gentiana*, тож було запропоновано виключити її з роду [35].

Таким чином, проведений аналіз попередніх досліджень показав, що із застосуванням генетичних маркерів для визначення філогенетичних зв'язків, можна знаходити суперечливі види, які потребуватимуть більш детального вивчення, та перегляду їх систематичного положення.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Рослинний матеріал

Матеріалом для дослідження слугували рослини трьох видів роду Тирлич (*Gentiana*), які відносяться до різних секцій та відрізняються за морфологією, анатомією, умовами зростання тощо, а також одного виду роду Тріптероспермум (*Tripterospermum*). Зразки *G. crassicaulis* (секція *Cruciata*), *G. scabra* (секція *Pneumonanthe*), *G. pannonica* (секція *Gentiana*), *Tripterospermum alutaceifolium* були отримані з ботанічного саду Боннського Університету, Німеччина (Botanische Gärten der Universität Bonn), ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна ННЦ "Інститут Біології" КНУ ім. Т.Г. Шевченка, а також від А. Фавре з Науково-дослідного інституту Сенкенберга, Франкфурт-на-Майні, Німеччина (Adrien Favre, Senckenberg Research Institute, Frankfurt am Main, Germany) відповідно.

2.2. Виділення ДНК зі свіжого та сухого рослинного матеріалу

Для роботи необхідні наступні інструменти, а саме: ступка фарфорова, пробірки пластикові з герметичними кришками об'ємом 2мл, шпатель, автоматичні піпетки-дозатори. В процедурі виділення ДНК використовують такі прилади: термостат водяний, мікроцентрифуга настільна типу Еппендорф, прилад для електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот в агарозному гелі.

Склад буферу для екстракції ДНК: 1.4 М NaCl, 20 мМ Na₃ЕДТА, 100 мМ Трис-НСl рН8.0 при 25°C, 2% ЦТАБ. Реактиви необхідні для екстракції та очистки ДНК - суміш хлороформ/ізоаміловий спирт у співвідношенні 24:1, 70%

етанол, фенол (забуферений 1М Трис-НСl, рН 8.0), суміш «фенол/хлороформ» (у співвідношенні 1:1), яка складається із фенолу насиченого 1М Трис-НСl, рН 8.0 та суміші хлороформу з ізоаміловим спиртом (24:1), ізопропанол, розчин РНКази А в концентрації 10мг/мл.

ТЕ буфер:

10 мМ Трис-НСl,
1 мМ ЕДТА, рН 8.0

2хЦТАБ буфер:

0,1 М Трис-НСl, рН=8.0
20-40 мМ ЕДТА, рН=8.0
1,4 М NaCl
2% Цетилтриметиламоній бромід

1хЦТАБ буфер:

50 мМ Трис-НСl, рН=8.0
10-20 мМ ЕДТА, рН=8.0
0,7 М NaCl

1% Цетилтриметиламоній бромід

Буфер для відмивки:

52% етанолу
10 мМ Трис-НСl рН=8.0
125 мМ NaCl
1 мМ ЕДТА

SB буфер (20х):

39 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (або 20 г безводної солі) доводимо до 1 л H_2O , рН доводимо до 8,5 борною кислотою H_3BO_3 .

Висушений рослинний матеріал (листок, наважка 50 мг) розтирали зі скляним піском в фарфоровій ступці до порошковидного стану, переносили в пробірку об'ємом 2 мл і додавали ~1 мл 1хЦТАБ буферу. Для отримання ДНК зі свіжого рослинного матеріалу використовували 2хЦТАБ буфер рівного об'єму (w:v). Для змивання залишків матеріалу зі ступки використовували 1хЦТАБ буфер у кількості до 0,5 від об'єму 2хЦТАБ буферу. Старанно перемішували до утворення гомогенної суспензії та інкубували на водяній бані при 65°C близько 30 - 60 хвилин. Далі додавали до неї рівний об'єм суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (24:1), перемішували до утворення білої емульсії та продовжували екстракцію з періодичним перемішуванням протягом 5 хв. Для розділення водної й органічної фаз суспензію центрифугували протягом 5 хв. в настільній центрифугі при 12000 об./хв.

Водну фазу переносили в нову пробірку і повторювали екстракцію сумішшю хлороформ/ізоаміловий спирт (24:1). Екстракцію проводили не менше 2-3 разів для повного очищення від інтерфази, домішок та пігментів.

Метод осадження/очищення обирали у залежності від кількості виділеної ДНК: якщо її багато, то використовували спирт, а якщо мало – сіліку. У випадках сильного забруднення використовували обидва способи у порядку: спирт – сіліка.

Осадження ізопропиловим спиртом. До водної фази додавали рівний об'єм ізопропанолу, швидко перемішували, і нуклеїнові кислоти одразу осаджували в настільній центрифугі при 12000 об./хв. 5 хв. (стадія дуже важлива, для того щоб скоротити накопичення осадом НК пігментів і полісахаридів). Зливши ізопропанол, ДНК двічі промивали 70% етанолом. Після промивання спиртом ДНК сушили і розчиняли в 200-500 мкл TE буферу при 55°C 10-30 хв. Для додаткового очищення ДНК від домішок РНК, розчин обробляли РНК-азою в кінцевій концентрації 100 мкг/мл при 37°C протягом 15-30 хв. Додавали рівний об'єм фенолу (забуференого 1М трис-НСl рН 8.0), а далі суміш фенол/хлороформ (у співвідношенні 1:1), 5хв перемішуючи до стану білої емульсії. ДНК осаджували 2-а об'ємами етанолу з 0,3 М NaCl протягом 1-16 год. при кімнатній температурі. Центрифугували при 12000 об./хв, двічі промивали 70% етанолом і розчиняли в 1хTE буфері рН 8.0 або 10 мМ Трис-НСl рН 8.0.

Очищення за допомогою діоксиду кремнію. До водної фази з ДНК додавали 2 об'єми 4 М (або 5 М) NaCl та 10-20 мкл суспензії діоксиду кремнію (виходячи з того, що 1 мг сіліки здатний зв'язувати 2,5-3,5 мкг ДНК) старанно перемішували та інкубували впродовж 5-15 хв при кімнатній температурі при постійному легкому перемішуванні. Осаджували сіліку коротким центрифугуванням 5-10 сек при 10-12 тис. об/хв. Промивали осад 4 М (або 5 М) NaCl, ресуспедуючи його повністю, і знову осаджували. Додали до осаду 0,5-1 мл буферу для відмивання і ресуспендували його, сіліку осаджували, і

після видалення супернатанту процедуру промивки повторювали ще раз. Осад підсушували 15 хв при кімнатній температурі, додавали 10-20* мкл 1x TE (або 0,1xTE або 10 mM трис-HCl pH 8.0 або деіонізовану воду в залежності від потреби) та інкубували впродовж 5-15 хв при кімнатній температурі (якщо погано розчиняється, можна підігрівати, але не вище 65°C). Об'єм буферу, який додається, визначають виходячи із можливої кількості ДНК. Сіліку осаджували центрифугуванням при 10-12 тис. об/хв 1-2 хв. Супернатант переносили у чисту пробірку, повторювали процедуру змивання ДНК з сіліки з половинним об'ємом 1xTE. Супернатанти об'єднували та додатково центрифугували 2-4 хв. при 10-12 тис. об/хв. для видалення залишків сіліки. Супернатант збирали, перевіряли якість та кількість ДНК за допомогою гел'єлектрофору і зберігали при -20 °C.

2.3. Електрофорез в агарозному гелі

Фракціонування нуклеїнових кислот проводили за допомогою електрофору в 1% або 1.4% агарозі в 1xSB буфері з додаванням етидій броміду при напрузі 30-90 В, залежно від камери та бажаного часу.

Для проведення електрофору потрібен прилад для горизонтального електрофору, форма для заливання гелю, спейсери, гребінка, палетка для приготування зразків для нанесення, автоматичні піпетки-дозатори (смплери). В процесі фракціонування ДНК використовують прилад для електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот у агарозному гелі.

1x SB буфер, агарозний гель, барвник бром феноловий синій, бромистий етидій.

1% агарозний гель (на 100 мл розчину):

1г агарози

5 мл 20xSB буферу

5 мкл етидій броміду

H₂O до кінцевого об'єму

Для приготування агарозного гелю зважували необхідну кількість агарози, додавали необхідний об'єм води. Перемішуючи, суміш нагрівали до розчинення агарози та однорідності. Після закипання, залишали охолоджуватись на підставці чи холодній водяній бані до 45-50°C і додавали необхідну кількість 20xSB буферу та бромистого етидію. Останній дуже небезпечний мутаген, тому дотримувались посилені заходи безпеки. В цей час готувалась форма для заливання гелю, виставлялись спейсери та гребінка. Охолоджений гель обережно заливали, аби не утворювались бульбашки повітря (якщо вони є, то їх потрібно видалити куточком смужки фільтрувального паперу або кінчиком носика сэмплера). Доки гель застигав, на палетці готувались зразки для нанесення. Компоненти змішували у порядку: 5-10 мкл дистильованої води, необхідна кількість зразку, 1,5 мкл бромфенолового синього. Після застигання гелю, гребінку та спейсери виймали, додавали SB буфер у кювету для електрофорезу так, щоб він покривав гель на 2-3 мм. Після нанесення зразків у лунки в агарозному гелі, кювету закривали кришкою, під'єднували до джерела струму з напругою 30-40 В. Через 10-15 хв. напругу збільшували до 100 В і залишали ще на 40-60 хвилин. При фракціонуванні продуктів ПЛР або інших ферментативних реакцій (з підвищеним вмістом солі) в SB буфері перші 15-20 хв розділення проводили при напрузі 15-25 В. Після від'єднання приладу від джерела струму, гель обережно діставали та просвічували на транслюмінаторі ультрафіолетовим випроміненням. Якщо розділення пройшло успішно і задовольняло дослідників, гель фотографували із використанням червоного фільтру. За необхідності, розділення можна продовжити поклавши гель назад у кювету для досягнення кращого результату. Після завершення роботи транслюмінатор витирали, буфер зливали, кювету мили, а гель складали у холодильник для зберігання.

2.4. ПЛР з праймерами до 5S рДНК

Ділянку 5S рДНК ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням пари праймерів p5S1 (5'–ATGCAAGCTTGACCTCCTGGGAAGTCC–3') і p5S2 (5'–GCATAAGCTTGCGGAGTTCTGATGGG–3').

Для приготування 20 мкл суміші використовували: 1 мкл ДНК (10-20 нг), 2 мкл 10х ПЛР-буферу, 2 мкл 10х MgCl₂ (25 мМ), 2 мкл 10х dNTP (2 мМ), по 1 мкл кожного з праймерів (10 нМ), 1 од. Таq-полімерази, деіонізовану воду до кінцевого об'єму 20 мкл. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії.

Ампліфікацію проводили в термоциклері Терцик MC2 («Біотехнологія», Росія). Ампліфікацію проводили в режимі:

- 1 цикл 95°C – 3 хв;
- 5 циклів (95°C – 30 с, 54°C – 30 с, 72°C – 1 хв);
- 30 циклів (94°C – 20 с, 55°C – 20 с, 72°C – 40 с);
- 1 цикл 72°C – 5 хв.

2.5. Виділення ампліфікованих фрагментів 5S рДНК з агарозного гелю

Для очищення ДНК знадобиться скальпель, пробірки пластикові з герметичними кришками типу Еппендорф. Прилади необхідні для очищення ДНК: термостат водяний, мікроцентрифуга настільна типу Еппендорф. Використовувались реагенти з набору Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («MBI Fermentas», Литва).

WB (washing buffer):	На 200 мл р-ну
Concentr.WB [з набору]	5 мл Concentr.WB [з набору]
Дистильована вода	95 мл Дистильована вода
Етанол (95-100%)	100 мл Етанол (95-100%)

BB (binding buffer):

На 100 мл р-ну

[з набору]

300 мкл BB на 100 мг гелю

SPS (silica powder suspension):

$\leq 2,5$ мкг ДНК – 5 мкл SPS

$> 2,5$ мкг ДНК – 2 мкл SPS/1 мкг ДНК

Вирізаний скальпелем необхідний фрагмент з гелю поміщали в еппендорф (1,5 чи 2 мл), зважували, та додавали зв'язуючого буферу BB у співвідношенні 3:1 (V:W). Перемішуючи, пробірку інкубували при 55°C протягом 5 хв до розчинення гелю. Якщо одержаний розчин жовтого кольору – рН оптимальний, а якщо помаранчевий чи фіолетовий, то потрібно додати 10 мкл 3 М ацетату натрію (рН=5,2) і перемішати до одержання жовтого розчину. У відповідності до кількості ДНК додавали ресуспендований SPS, та інкубували протягом 5 хв при 55°C для зв'язування молекул ДНК і кристалів сіліки, не забуваючи перемішувати. Якщо вміст ДНК високий у зразку, то час інкубації збільшували до 15 хв. Протягом 5 секунд, при 10-12 тис.об./хв відцентрифугувували до утворення осаду. Надосадову рідину обережно виливали так, щоб сіліка з ДНК не випали з пробірки. Якщо ще лишилась агароза, то можна додати 300 мкл BB для її розчинення і знову нагріти суспензію кілька хвилин при 55°C. До осаду додавали 500 мкл розведеного з етанолом льодяного WB, ресуспендовували, відцентрифугувували протягом 5 секунд, і виливали надосадову рідину. Цей процес повторювали ще 3 рази. За необхідності, протягом 10-15 хв осад висушували від етанолу, що може інгібувати ферментативні реакції. Осад ресуспендовували у потрібному об'ємі деіонізованої води або TE буферу, та інкубували протягом 5 хв при 55°C, перемішуючи. Центрифугували протягом 1 хв і відбирали супернатант в нову пробірку, не торкаючись осаду. Елюцію повторювали іншою аліквотою води або TE буферу. Для остаточного видалення залишків сіліки осад центрифугували протягом 30 секунд і супернатант переносили у нову пробірку.

2.6. Гідроліз фрагментів 5S рДНК ендонуклеазою рестрикції

Для гідролізу фрагментів готують суміш по 30 мкл на 1 зразок:

буфер (10x) 3 мкл

ендонуклеаза рестрикції 1 мкл

розчин ДНК зразків або плазміди 26 мкл

Гідроліз проводили при температурі, рекомендованій для конкретної рестриктази фірмою-виробником. Реакційну суміш залишали в термостаті на ніч (~ 12-16 год). Для видалення з розчину рестриктази проводили денатурацію ферменту при 80°C протягом 20 хв і переосаджували ДНК 96% етанолом.

2.7. Лігування фрагментів 5S рДНК і плазміди рUC18

Одним з етапів молекулярного клонування є лігування – зшивання плазміди та фрагментів ДНК (вставки, в нашому випадку МГС 5S рДНК). Для цього плазміда має бути дефосфорильованою, щоб вона не лігувалась сама на себе.

Реакційна суміш для лігування (15 мкл) містила:

розчин гідролізованих фрагментів ДНК 11,5 мкл

рUC18 (гідролізована відповідною ендонуклеазою рестрикції) 1 мкл

лігаза T4 1 мкл

10x буфер для лігування 1,5 мкл (щоб в кінцевому об'ємі реакційної суміші був 1x).

В пробірку лігазу вносили останньою і тримаючи за верх пробірки чи кришку, аби вона не грілася. Тоді суміш перемішували і ставили на ніч (~ 12-16 год) у холодильник при t 4-6°C. Для перевірки лігування проводили електрофорез. На електрофореграмі при порівнянні з нативною плазмідною на доріжках з рекомбінантною плазмідною має бути видно важчі фрагменти.

Оскільки може відбуватися лігування фрагментів МГС 5S рДНК самих на себе, то на фореграмі можуть бути «сходинки».

2.8. Отримання компетентних клітин *Escherichia coli*

Для отримання компетентних клітин *E. coli* використовували штам XL-blue 1. Для цього колонію (або її частину) поміщали в 5 мл рідкого поживного середовища LB при 37°C у термостат на ніч (~ 12-16 год). Потім отриману культуру переливали в колби в 50 мл рідкого поживного середовища LB і дорощували на шейкері при 37°C ще 3-4 години до помітного помутніння середовища. Для точного визначення кількості культури використовують ФЕК. При $\lambda=550$ нм $A=0.3$ відносно контролю (те саме середовище але без культури). Компетентні клітини одержують з культури в фазі активного росту, тож сильного помутніння не має бути.

Культуру витримували протягом 10 хвилин на льоду і тоді центрифугували 10 хвилин при 3-5 тис. об./хв. Надосад виливали, а до осаду додавали 10 мл холодного буферу (10 мМ трис-HCl рН 8.0 + 50 мМ CaCl₂) і ресуспендовували.

Знову витримували 5-10 хв на льоду і центрифугували. Осад у формі кільця ресуспендовували у 2 мл холодного буферу, ставили на лід і в холодильник (в стерильній пробірці), де компетентні клітини можуть зберігати свою компетентність до 1 тижня. Якщо центрифуга має систему охолодження, то на лід можна не ставити.

2.9. Трансформація компетентних клітин *E.coli* рекомбінантною плазмідною

В еппендорф відбирали 100 мкл збовтаної культури компетентних клітин, додавали 1-2 мкл рекомбінантної плазмідної і ставили на лід на 30 хв.

Еппендорф поміщали у водяну баню при 42°C на 1-1,5 хв, і знову повертали на лід на 5-10 хв. Додавали 400 мкл LB середовища і поміщали в термостат на 1 год при 37°C. Для white-blue селекції в чашку з агаризованим середовищем LB, що містить антибіотики тетрациклін (12,5 мг/л; на 50 мл середовища 0,6 мг) і ампіцилін (50мг/л; на 50 мл середовища – 2,5 мг), додавали по 40 мкл індикаторів X-gal і PTG і розтирали по поверхні середовища.

Відбирали 100 мкл культури (з 500 мкл, що в термостаті), вносили на чашку та розтирали. Чашки Петрі з розсіяними культурами ставили на ніч в термостат при 37°C.

Одержані білі колонії розсівали по секторах на чашках Петрі з антибіотиками і втертими X-gal і PTG. Потрібно брати центральну колонію, адже ті, що довкола можуть рости за рахунок «виїдання» антибіотику центральною колонією.

Для нарощування і подальшого виділення плазміді нічну культуру поміщали в 10-20 мл рідкого середовища на шейкері при 37°C. Попередньо в середовище додавали ампіцилін і тетрациклін.

2.10. Виділення плазміді методом лужного лізису

Клітини з нічної культури осаджували центрифугуванням на холоді протягом 7-10 хв при 3 тис.об. Середовище відбирали піпеткою (або просто зливали) щоб осад був максимально сухим, і ставили на лід. (В такому стані клітини можна зберігати в холодильнику кілька днів). До осаду додавали 100 мкл охолодженого буферу для лізису (80+20 для сполоскування центрифужної пробірки). Клітини з буфером ресуспендовували на шейкері протягом 5 хв. Додавали двократний об'єм розчину NaOH-SDS, перемішували перевертаючи еппендорф 2-3 рази та поміщали на лід на 5 хв.

Буфер для лізису:

50мМ глюкоза

На 1 мл р-ну

9 мг глюкози

10мМ ЕДТА	20 мкл ЕДТА
25мМ трис-НCl pH=8.0	25 мкл трис-НCl
4 мг/мл лізоциму (дод. перед викор.)	4 мг
dH ₂ O	955 мкл

Розчин NaOH-SDS :	На 1 мл р-ну
0,2М NaOH	20 мкл NaOH
1% SDS	100 мкл SDS
dH ₂ O	880 мкл

Додавали 0,5 вихідного об'єму охолодженого 3М ацетату калію чи натрію. Обережного перевертали і в перевернутому положенні поміщали на лід на 5 хв. Центрифугували при 10 тис.об. протягом 5 хв. Відбирали супернатант.

Для позбавлення від РНК додавали рівний об'єм 5М LiCl або 1/3 початкового об'єму 10М LiCl (до кінцевої концентрації 2,5М). Витримували 30 хв на льоду, центрифугували 5 хв при 10 тис.об., відбирали супернатант. До супернатанту додавали рівний об'єм суміші фенол-хлороформ і перемішували протягом 10 хв. Центрифугували 5 хв при 10 тис.об. і відбирали верхню фазу.

Додавали 2 об'єми 96% етанолу кімнатної температури, перевертали еппендорф і залишали на 2 хв. Осад збирали центрифугуванням протягом 5 хв, зливали спирт та перевертали, щоб залишки рідини стекли. Еппендорф промивали 70% етанолом та висушували (у вакуумі). Осад розчиняли у 1хTE буфері або деіонізованій воді (10-20 мкл).

Обробляли РНКазою 50-100 γ/мл, 20 хв при 37°C. Очищували фенол-хлороформом і осаджували спиртом.

2.11. Аналіз послідовностей рДНК

Оскільки наше дослідження було перервано через карантин на етапі сиквенування отриманих клонів, було вирішено провести аналіз вже

доступних в базі даних GenBank послідовностей МГС генів 5S рРНК видів роду *Gentiana*, а також включити до аналізу послідовності BTC2 та гену 5.8S рРНК цих самих видів, послідовності яких наявні у GenBank. Види разом із назвами секцій, до яких вони відносяться, та номери доступу до послідовностей в базі даних GenBank представлені у табл.3.1. Також у роботу в якості «outgroup» був залучений *Centaurea erythraea* родини Gentianaceae. Сиквенс МГС 5S рДНК зразка цього виду люб'язно наданий д.б.н., проф. Волковим Р.А. з Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича.

Аналіз та вирівнювання послідовностей із використанням алгоритму ClustalW проводили у програмі MEGA. Параметри для вирівнювання: Gaps/Missing Data Treatment - Partial deletion, Gap Opening Penalty - 10, Gap Extension Penalty - 0.05. Філогенетичні дерева побудовані за алгоритмом Neighbour Joining на основі моделі Kimura 2-parameter, що була підібрана за допомогою тесту на найкращу модель. Bootstrap аналіз був виконаний для 1000 реплік задля обрахунку оцінки достовірності топологій дерев.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

У процесі роботи було отримано клони з послідовностями МГС 5S рДНК для всіх перерахованих у підрозділі 2.1. видів. Проте через карантин ці послідовності не були передані у Німеччину для сиквенування. Тому філогенетичні дослідження видів роду *Gentiana* проводили, порівнюючи отримані раніше нуклеотидні послідовності 5S рДНК, а також ті, які наявні у базі даних GenBank.

Послідовності МГС 5S рДНК *G. lutea*, *G. asclepiadea* [3] та *Centaureum erythraea* були надані к.б.н. Мельником В.М., ІМБіГ НАНУ та д.б.н., проф. Волковим Р.А., ЧНУ відповідно. Пошуком у базі даних GenBank було знайдено послідовності МГС 5S рДНК, BTC2 та гену 5.8S рРНК для інших видів роду *Gentiana*, які було залучено до подальшого аналізу. Ці види разом із назвами секцій, до яких вони відносяться, номерами послідовностей в базі даних GenBank наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Види, послідовності МГС 5S рДНК, BTC2 та гену 5.8S рРНК яких використано для порівняльного аналізу

Секція	Вид	Номер в GenBank		
		МГС 5S рДНК	5.8S рДНК	BTC2 рДНК
<i>Calathianae</i>	<i>G. verna</i>	EF626768	KT907736	AJ223090
<i>Gentiana</i>	<i>G. lutea</i>	[3]*	KC535855	Z48119
***	<i>G. asclepiadea</i>	[3]*	AJ580549	Z48076

Продовження табл. 3.1

<i>Monopodiae</i>	<i>G. rigescens</i>	GQ864058	GQ864021	MH047565
<i>Pneumonanthe</i>	<i>G. manshurica</i>	GQ864048	GQ864017	MH047570
	<i>G. triflora</i>	GQ864053	GQ864019	MF096370
	<i>G. scabra</i>	GQ864042	GQ864015	MF287200
—	<i>Centaurium erythraea</i>	**	KC535851	AY047864

Примітки:

1. * – послідовності надані к.б.н. Мельником В.М., ІМБіГ НАНУ;
2. ** – послідовності надані д.б.н., проф. Волковим Р.А., ЧНУ;
3. *** – приналежність *G. asclepiadea* до однієї з секцій роду має суперечливий характер і не визначена остаточно.

3.1. Аналіз за послідовністю МГС 5S рДНК

Вирівнювання та порівняльний аналіз послідовностей МГС 5S рДНК дозволили виділити дві групи видів за подібністю будови цієї ділянки гена (Додаток А1). До першої групи увійшли три види, які належать до секції *Pneumonanthe*. Другу групу сформували решта досліджуваних видів роду *Gentiana*, окрім *G. rigescens*. Вид *G. rigescens* мав найкоротшу з усіх досліджуваних видів послідовність МГС (218 п.н.), і при цьому наявні ділянки виявили часткову подібність до другої групи. Але характерної цієї групі послідовності цей вид не мав, тому ми не змогли віднести його ні до якої групи. *Centaurium erythraea* суттєво відрізнявся як від першої, так і від другої групи, і використовувався у якості зовнішньої групи.

Порівняльний аналіз всередині першої групи показав високий рівень подібності між цими послідовностями. Відносно *G. triflora* рівень ідентичності *G. manshurica* та *G. scabra* становить близько 92% (50 та 53 поліморфних нуклеотиди з 632 відповідно). У другій групі показники рівня ідентичності дещо нижчі: *G. asclepiadea* має 85% та 89% подібності до *G. verna* та *G. lutea* відповідно (97 та 70 поліморфних нуклеотидів). Виявлені нуклеотидні відмінності відносяться до замінів типу С/Т та А/Г.

Ділянка МГС 5S рДНК усіх досліджуваних нами видів містить на початку консервативний оліго-дТ мотив, який відіграє роль ділянки термінації транскрипції для РНК-полімерази III еукаріот. АТ-багату ділянку, що передуює кодувальному регіону гена 5S рРНК і є сайтом ініціації транскрипції, містили всі досліджувані види. У *Centaureum erythraea* АТ-бокс міститься у 336 положенні довжиною 10 п.н., що є дуже коротким у порівнянні із АТ-ділянками видів роду *Gentiana*.

Головні відмінності між видами пов'язані з частиною МГС, яка знаходиться між цими консервативними сайтами. У представників першої групи за сайтом термінації містяться СТ-багата ділянка довжиною близько 80 п.н., за якою йде GC-багатий регіон приблизно такого ж розміру. Водночас, у всіх представників другої групи, в цій частині МГС знаходиться відносно консервативна ділянка, відсутня у видів першої групи, у складі якої виявлено послідовність довжиною 60 п.н. з високою гомологією до кодувальної частини гена 5S рРНК [3].

Із дендрограми, побудованої за алгоритмом Neighbour Joining на основі вирівнювання послідовностей МГС 5S рДНК, видно, що види згрупувалися згідно секцій, визначених раніше в межах роду (рис. 3.1). Види секції *Pneumonanthe* – *G. triflora*, *G. scabra* і *G. manshurica* сформували один кластер. До другого увійшли *G. asclepiadea*, *G. verna* та *G. lutea*, що були об'єднані у одну групу. *G. rigescens*, як і було зазначено, не відноситься до жодної з груп, проте є більш наближеною до секції *Pneumonanthe*. Хоча вважається, що *G.*

asclepiadea не має чітко визначеного таксономічного положення, у роботі [3] було показано наближеність цього виду до секції *Gentiana* за МГС гену 5S рРНК і те саме можна спостерігати на отриманій нами філограмі.

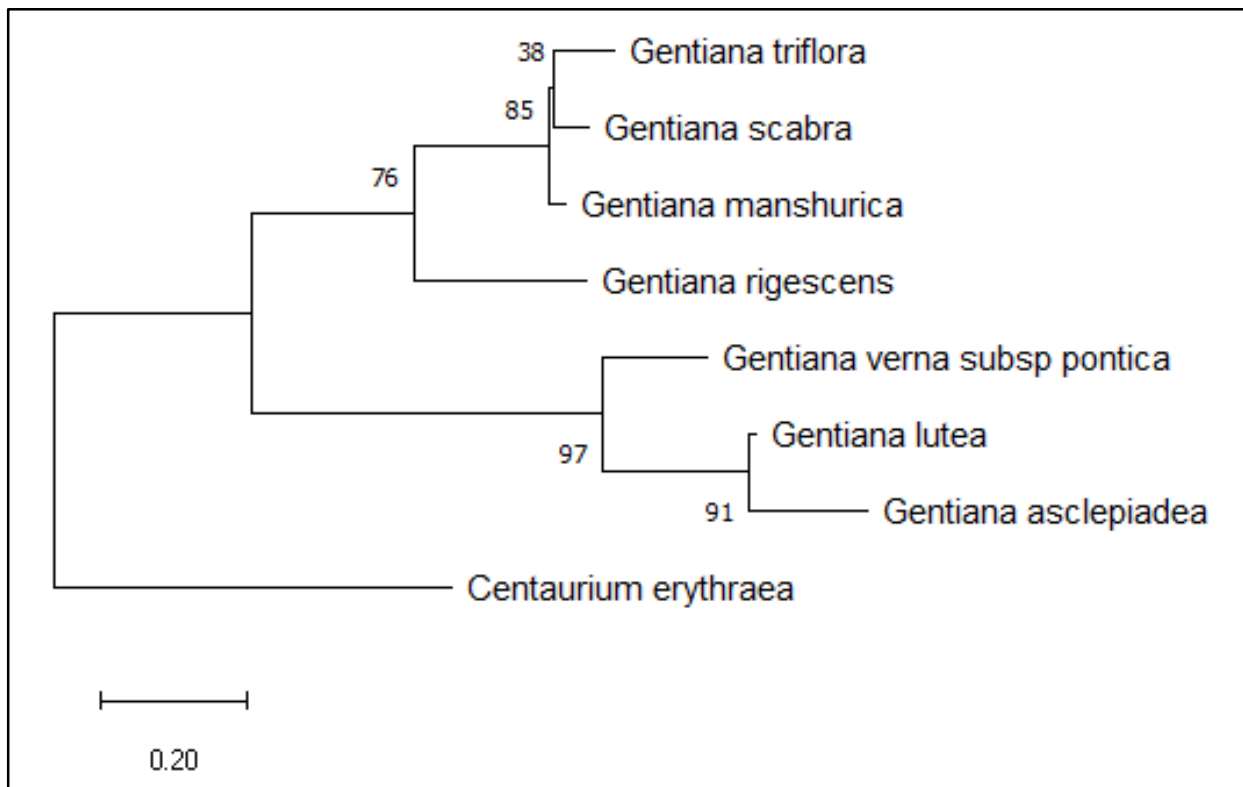


Рис. 3.1. Філограма видів роду *Gentiana*, побудована на основі послідовності МГС 5S рДНК за алгоритмом Neighbour Joining. В якості зовнішньої групи використано *Centaurium erythraea*.

3.2. Аналіз за геном 5.8S рРНК

Оскільки кодуючі ділянки рДНК генів консервативні, послідовності за 5.8S рДНК мали низьку мінливість, що виявлялась переважно одонуклеотидними замінами (Додаток А2). Три види з секції *Pneumonanthe* мають між собою 100% ідентичність, адже їх послідовності абсолютно однакові. Послідовність *Centaurium erythraea*, як і очікувалось, має найбільшу кількість відмінностей, і використовувалась у якості зовнішньої групи.

Кількість поліморфних нуклеотидів між видами роду *Gentiana* коливалась в межах 33-37 з 693, а у порівнянні з *Centaureum erythraea* – 90-110 п.н. Тож відносно *G. triflora* рівень ідентичності *G. asclepiadea* та *G. lutea* складає 94%, *G. verna* – 93%, *G. rigescens* – 96%, а для *Centaureum erythraea* – 80%. Виявлені нуклеотидні відмінності відносяться до замінів типу С/Т та А/Г.

На рис. 3.2 представлена дендрограма, побудована за алгоритмом Neighbour Joining на основі вирівнювання послідовностей гену 5.8S рРНК з *Centaureum erythraea* у якості зовнішньої групи. Так само, як і у випадку з МГС гену 5S рРНК видно, що види згрупувалися згідно визначених секцій. *G. triflora*, *G. scabra* і *G. manshurica* сформували кластер секції *Pneumonanthe*, до якого наближеним є *G. rigescens* з секції *Monopodiae*. *G. verna* є більш наближеною до *G. asclepiadea* та *G. lutea*, які в свою чергу, об'єднані в кластер, що знову вказує на належність *G. asclepiadea* до секції *Gentiana*.

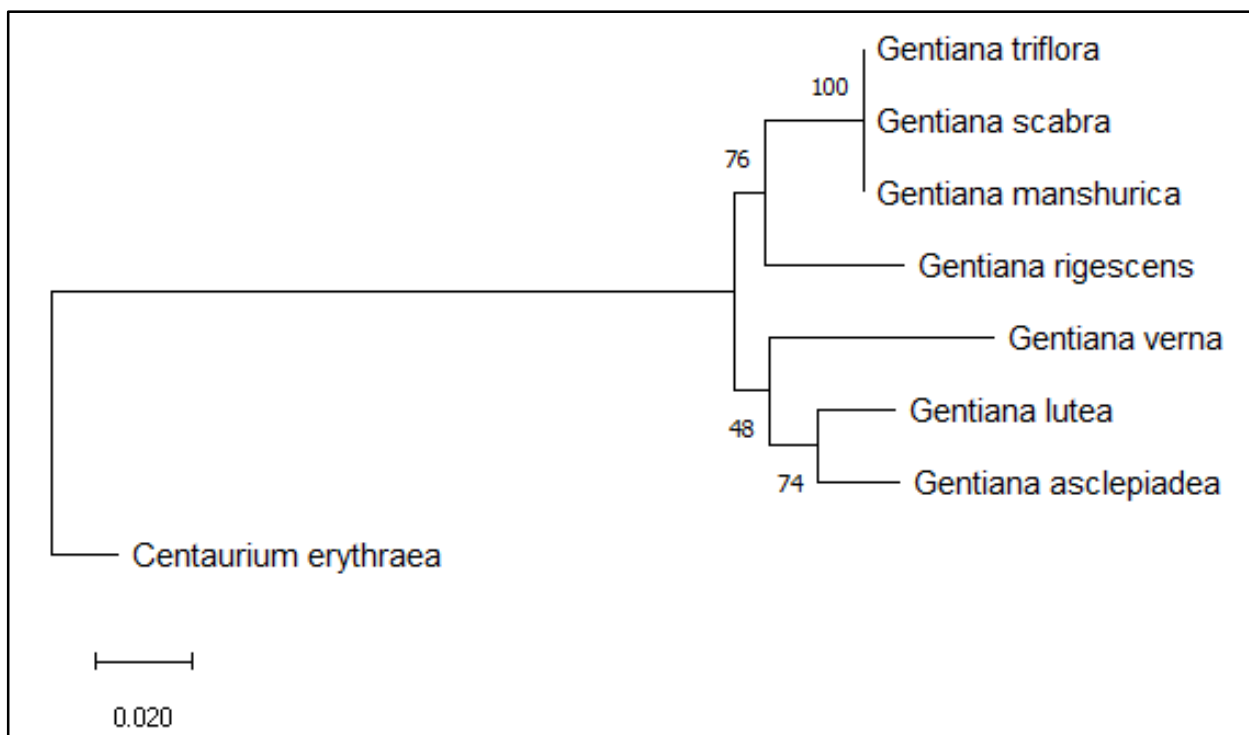


Рис. 3.2. Філограма видів роду *Gentiana*, побудована на основі послідовності 5.8S рДНК за алгоритмом Neighbour Joining. В якості зовнішньої групи використано *Centaureum erythraea*.

3.3. Аналіз за послідовністю BTC2

При порівнянні за BTC2 досліджувані послідовності вирівнялись схожим чином до 5.8S рДНК. Хоча BTC2 не відноситься до кодуєчих послідовностей, він містить консервативну ділянку, чим і пояснюється схожість вирівнювання із 5.8S рДНК. Проте BTC2 більш варіабельний ніж 5.8S рДНК, що можна побачити за більшою кількістю поліморфних нуклеотидів між послідовностями (Додаток А3). Можна виділити дві високо варіабельні ділянки, які розташовуються з обох кінців BTC2. *G. scabra* і *G. manshurica* мали майже ідентичні послідовності, що відрізняються між собою лише за довжиною, тобто відсутністю останнього нуклеотиду у першого виду. Відносно *G. triflora* ці види мали по 6 поліморфних нуклеотидів з 234, і відповідно мають 97% рівень ідентичності. Види *G. asclepiadea* та *G. rigescens* мали із *G. triflora* рівень подібності 92% (16 і 18 поліморфних нуклеотидів відповідно), а *G. verna* і *G. lutea* – 90% і 89% (21 та 24 поліморфних нуклеотидів відповідно). *Centaureum erythraea* мав 48 відмінних нуклеотидів і рівень подібності 77%. Виявлені нуклеотидні відмінності відносяться до замін типу С/Т та А/Г.

Дендрограма, побудована за алгоритмом Neighbour Joining на основі вирівнювання послідовностей BTC2, демонструє схожі результати із попередніми (рис. 3.3). Види секції *Pneumonanthe* – *G. triflora*, *G. scabra* і *G. manshurica* сформували кластер, до якого наближений *G. rigescens*. Порівняно із дендрограмою побудованою за МГС 5S рДНК, де *G. triflora* та *G. scabra* розташовані поруч, за BTC2 *G. scabra* і *G. manshurica* мають тісніший філогенетичний зв'язок. Хоча *G. asclepiadea*, *G. verna* та *G. lutea* не формують окрему об'єднану групу, вони знаходяться поруч.

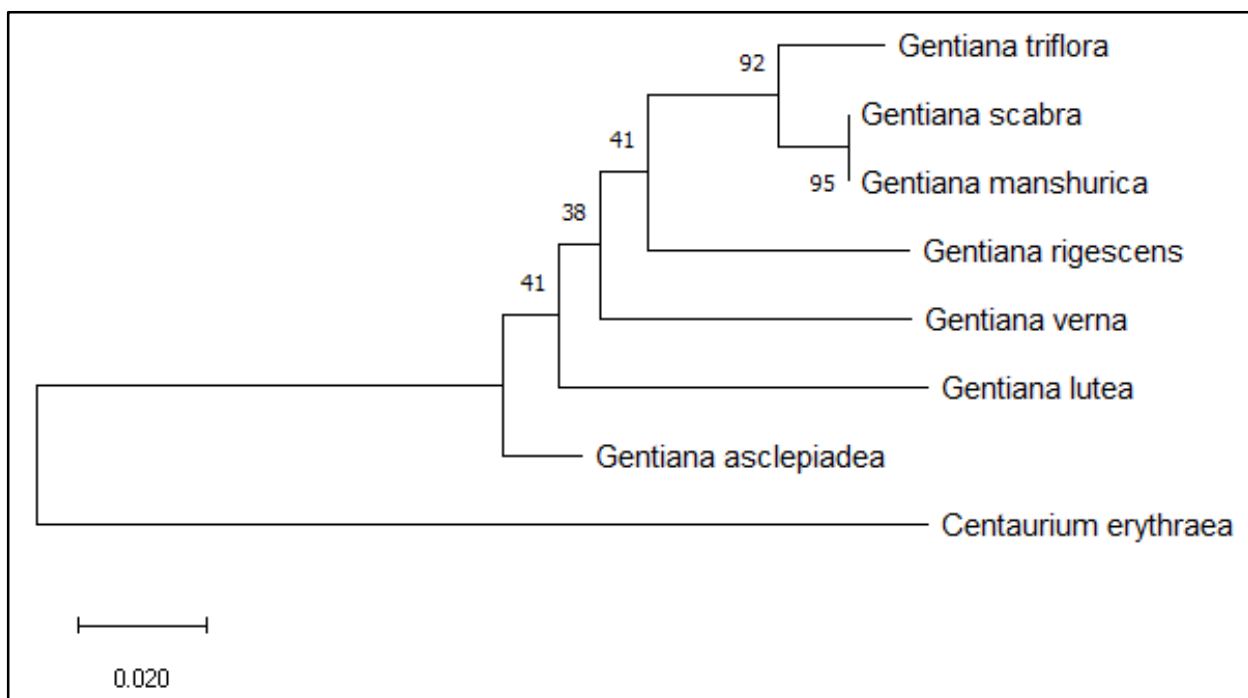


Рис. 3.3. Філограма видів роду *Gentiana*, побудована на основі послідовності BTC2 за алгоритмом Neighbour Joining. В якості зовнішньої групи використано *Centaurium erythraea*.

3.4. Обговорення результатів

Для аналізу філогенетичних зв'язків було взято 8 видів: *G. verna* (секція Calathianae), *G. lutea* (секція *Gentiana*), *G. asclepiadea* (невизначена секція), *G. rigescens* (секція Monopodiae), *G. manshurica*, *G. triflora*, *G. scabra* (секція *Pneumonanthe*) та *Centaurium erythraea*. При порівнянні за всіма трьома маркерами, на філограмах види секції *Pneumonanthe* об'єднувались у кластер. Неподалік від нього завжди розташовувався вид *G. rigescens*. Види *G. lutea*, і *G. asclepiadea* розміщувались разом, а *G. verna* біля них.

G. asclepiadea на сьогодні не має чітко визначеного таксономічного положення, оскільки різні дослідники на основі порівняльного аналізу певних морфологічних ознак відносили цей вид до різних секцій. Так, досить

тривалий час його включали до секції *Pneumonanthe*. Проте на основі результатів порівняльного аналізу послідовностей ядерних (ВТС 35S рРНК, МГС 5S рДНК) та пластидних (*atpB-rbcL*, *trnL-F*) генів він був віднесений до секції *Gentiana* [3]. *G. lutea*, разом з яким формував групу вид *G. asclepiadea*, належать до секцій *Gentiana*. Також за результатами аналізу послідовностей, ідентичність досліджуваних ділянок рДНК *G. asclepiadea* та *G. lutea* становив від 90% і більше, що також свідчить про спорідненість цього виду з представниками секції *Gentiana*.

Також можна сказати, що розрізнити близькоспоріднені види *G. scabra* та *G. manshurica* вдалося тільки за допомогою послідовності МГС 5S рДНК, а при використанні гену 5.8S рРНК не можна було розрізнити види секції *Pneumonanthe*. Таким чином, для ДНК-автентифікації цих видів використання послідовності гену 5.8S рРНК є недоцільним та не ефективним.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

В нашій роботі ми дослідили філогенетичні зв'язки між видами роду *Gentiana*. Аналіз літературних джерел показав, що Тирлич (*Gentiana* L.) є типовим, найчисленнішим за видовим складом у флорі України родом родини *Gentianaceae*. Через наявність агрегатних видів у межах роду, відсутність чітких родових меж, складність визначення систематичної цінності та ступеня мінливості ознак, створення загальновизнаної системи для роду *Gentiana* традиційними методами дуже ускладнене. Тому для вирішення цих питань та уточнення систематики стали використовувати у якості факторів для розподілу організмів різноманітні генетичні маркери, в тому числі й гени рибосомної ДНК. Особливості структури генів рДНК роблять їх придатною моделлю для з'ясування проблем екології, популяційної генетики, селекції та систематики.

Для порівняння було використано послідовності рДНК, які суттєво відрізняються за швидкістю еволюції. Вперше було одночасно застосовано ділянки МГС 5S рДНК, BTC2 та гену 5.8S рРНК для визначення філогенетичних зв'язків роду *Gentiana*. Проведений аналіз показав, що філогенетичні зв'язки між таксонами відповідають класифікації цих видів на основі морфологічних, анатомічних, екологічних та інших критеріїв. Результати нашої роботи вписуються у загальну картину досліджень тирличів із використанням ДНК-маркерів для визначення філогенії, які були описані у підрозділі 1.8.

Проведений філогенетичний аналіз показав, що для визначення таксону на рівні виду потрібно використовувати найбільш еволюційно мінливий МГС 5S рДНК, тому що використання більш консервативних ділянок рибосомних

генів, таких як BTC2, і тим більше 5.8S рДНК, не завжди дозволяє відокремити близькоспоріднені види.

З цієї точки зору цікаво було б дослідити МГС 35S рДНК. Проте на сьогоднішній день у літературі відсутні дані про секвеновані послідовності цієї ділянки геному у тирличів. Відомо тільки, що ця ділянка є варіабельною за довжиною навіть у межах одного геному [40].

ВИСНОВКИ

1. Отримано клоновані послідовності міжгенного спейсера 5S рДНК видів роду *Gentiana*, а також проведено дослідження і уточнення філогенетичних зв'язків між представниками роду *Gentiana* за поліморфізмом послідовностей МГС 5S рДНК, ВТС2 та гену 5.8S рРНК.
2. Філогенетичний аналіз 7 видів 4 різних секцій роду *Gentiana* (*G. verna*, *G. lutea*, *G. asclepiadea*, *G. rigescens*, *G. manshurica*, *G. triflora*, *G. scabra*, а також *Centaurium erythraea* у якості зовнішньої групи) показав, що за поліморфізмом послідовностей МГС 5S рДНК, ВТС2 та гену 5.8S рРНК види розділяються на групи відповідно до їх ботанічної класифікації.
3. За результатами аналізу послідовностей, ідентичність досліджуваних ділянок рДНК *G. asclepiadea* і *G. lutea*, які багатьма дослідниками відносяться до різних секцій (*Pneumonanthe* і *Gentiana*, відповідно), становив більше 90%, що свідчить про спорідненість цих видів.
4. Показано, що для ДНК-автентифікації видів секції *Pneumonanthe* використання послідовності гену 5.8S рРНК є недоцільним та неефективним.
5. Продемонстровано, що незважаючи на розташування у різних кластерах рДНК, МГС 5S рДНК та ген 5.8S рРНК досліджених видів роду *Gentiana* дають подібні результати філогенетичних порівнянь.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Shiyan NM. A review of the taxonomy and distribution of the gentianaceae in the Ukraine. In: The Gentianaceae - Volume 1: Characterization and Ecology. 2014.
2. Mel'nyk VM, Drobyk NM, Twardovska MO, Kunakh VA. Karyology of European species of genus *Gentiana* L. In: The Gentianaceae - Volume 1: Characterization and Ecology. 2014.
3. Мельник В.М., Андреев І.О., Мирюта Г.Ю. КВА. ПОЛІМОРФІЗМ МІЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА ГЕНІВ 5S рРНК ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ *GENTIANA* L. 2017;42–6.
4. Мельник В.М., Андреев І.О., Мирюта Г.Ю. КВА. ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНІВ 5S рРНК ВИДІВ РОДУ *GENTIANA* L. Сучасні проблеми генетики, екології та біотехнології. :273–6.
5. Ho T.-N. LS-W. The infrageneric classification of *Gentiana* (Gentianaceae). Bull Br Museum (Natural Hist. 1990;20(2):169–92.
6. Zhang XL, Yuan YM, Ge XJ. Genetic structure and differentiation of *Gentiana atunsiensis* W. W. Smith and *G. striolata* T. N. Ho (Gentianaceae) as revealed by ISSR markers. Bot J Linn Soc. 2007;154(2).
7. Kunakh VA, Mel'Nyk VM, Drobyk NM, Andreev IO, Spiridonova K V., Twardovska MO, et al. Genetic variation induced by tissue and organ culture in gentiana species. In: The Gentianaceae - Volume 2: Biotechnology and Applications. 2015.
8. Liu J, Yan HF, Ge XJ. The use of DNA barcoding on recently diverged species in the genus *Gentiana* (Gentianaceae) in China. PLoS One. 2016;11(4).
9. Wong KL, But PPH, Shaw PC. Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal *Gentiana* species and their adulterants.

- Chinese Med (United Kingdom). 2013;8(1).
10. Mosula MZ, Andreev IO, Bublyk OM, Mel'Nyk VM, Konvalyuk II, Drobyk NM, et al. Molecular markers to assess genetic diversity of *Gentiana lutea* L. from the Ukrainian Carpathians. *Plant Genet Resour Characterisation Util.* 2015;13(3).
 11. Hamby RK, Zimmer EA. Ribosomal RNA as a Phylogenetic Tool in Plant Systematics. In: *Molecular Systematics of Plants*. 1992.
 12. Волков Р.А.; Панчук І.І.; Борисюк Л.Г.; Борисюк М.В. рДНК РОСЛИН: ОРГАНІЗАЦІЯ, ЕВОЛЮЦІЯ, ЗАСТОСУВАННЯ. *Цитология и генетика*. 2003;37(1).
 13. Яворська Н.Й., Воробець Н.М. СМІ. КУЛЬТУРА КОРЕНІВ *GENTIANA CRUCIATA* L. IN VITRO. *Наук зап Терноп нац пед ун-ту Сер Біол*. 2018;3–4(74):32–7.
 14. Червона книга України [Internet]. Available from: <https://redbook-ua.org/plants/region>
 15. Drobyk NM, Mel'nyk VM, Twardovska MO, Konvalyuk II, Kunakh VA. Tissue and organ cultures of gentians as potential sources of xanthones and flavonoids. In: *The Gentianaceae - Volume 2: Biotechnology and Applications*. 2015.
 16. Srivastava S, Bhargava M, Sharma A. DNA barcoding of medicinal plants. In: *Medicinal Plants - Recent Advances in Research and Development*. 2016.
 17. Ganie SH, Upadhyay P, Das S, Prasad Sharma M. Authentication of medicinal plants by DNA markers. Vol. 4, *Plant Gene*. 2015.
 18. Zhokhova E V., Rodionov A V., Povydysh MN, Goncharov MY, Protasova YA, Yakovlev GP. Current State and Prospects of DNA Barcoding and DNA Fingerprinting in the Analysis of the Quality of Plant Raw Materials and Plant-Derived Drugs. *Biol Bull Rev*. 2019;9(4).
 19. Sarwat M, Yamdagni MM. DNA barcoding, microarrays and next generation sequencing: Recent tools for genetic diversity estimation and authentication of

- medicinal plants. Vol. 36, Critical Reviews in Biotechnology. 2016.
20. Intharuksa A, Sasaki Y, Ando H, Charoensup W, Suksathan R, Kertsawang K, et al. The combination of ITS2 and psbA-trnH region is powerful DNA barcode markers for authentication of medicinal Terminalia plants from Thailand. *J Nat Med*. 2020;74(1).
 21. Ladani M, Parabia F. DNA Barcoding: An identification of Medicinal plants, Databases and a Promising Future. *Quest*. 2014;2(5):12.
 22. Vassou SL, Kusuma G, Parani M. DNA barcoding for species identification from dried and powdered plant parts: A case study with authentication of the raw drug market samples of *Sida cordifolia*. *Gene*. 2015 Mar 15;559(1):86–93.
 23. Srivastava AK, Schlessinger D. Structure and organization of ribosomal DNA. *Biochimie*. 1991;73(6).
 24. Garcia S, Kovařík A, Leitch AR, Garnatje T. Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. *Plant J*. 2017;89(5).
 25. Rogers SO, Bendich AJ. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol Biol*. 1987;9(5).
 26. Neves N, Delgado M, Silva M, Caperta A, Morais-Cecílio L, Viegas W. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. Vol. 109, *Cytogenetic and Genome Research*. 2005.
 27. Heslop-Harrison JSP, Schwarzacher T. Organisation of the plant genome in chromosomes. *Plant J*. 2011;66(1).
 28. Shaw PJ, McKeown PC. The structure of rDNA chromatin. *Protein Rev*. 2011;15.
 29. Шелифіст АЄ, Тинкевич ЮО, Волков РА. МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ 5S рДНК *BRUNFELSIA UNIFLORA* (POHL.) D. DON. 2018;3680:61–8.
 30. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*.

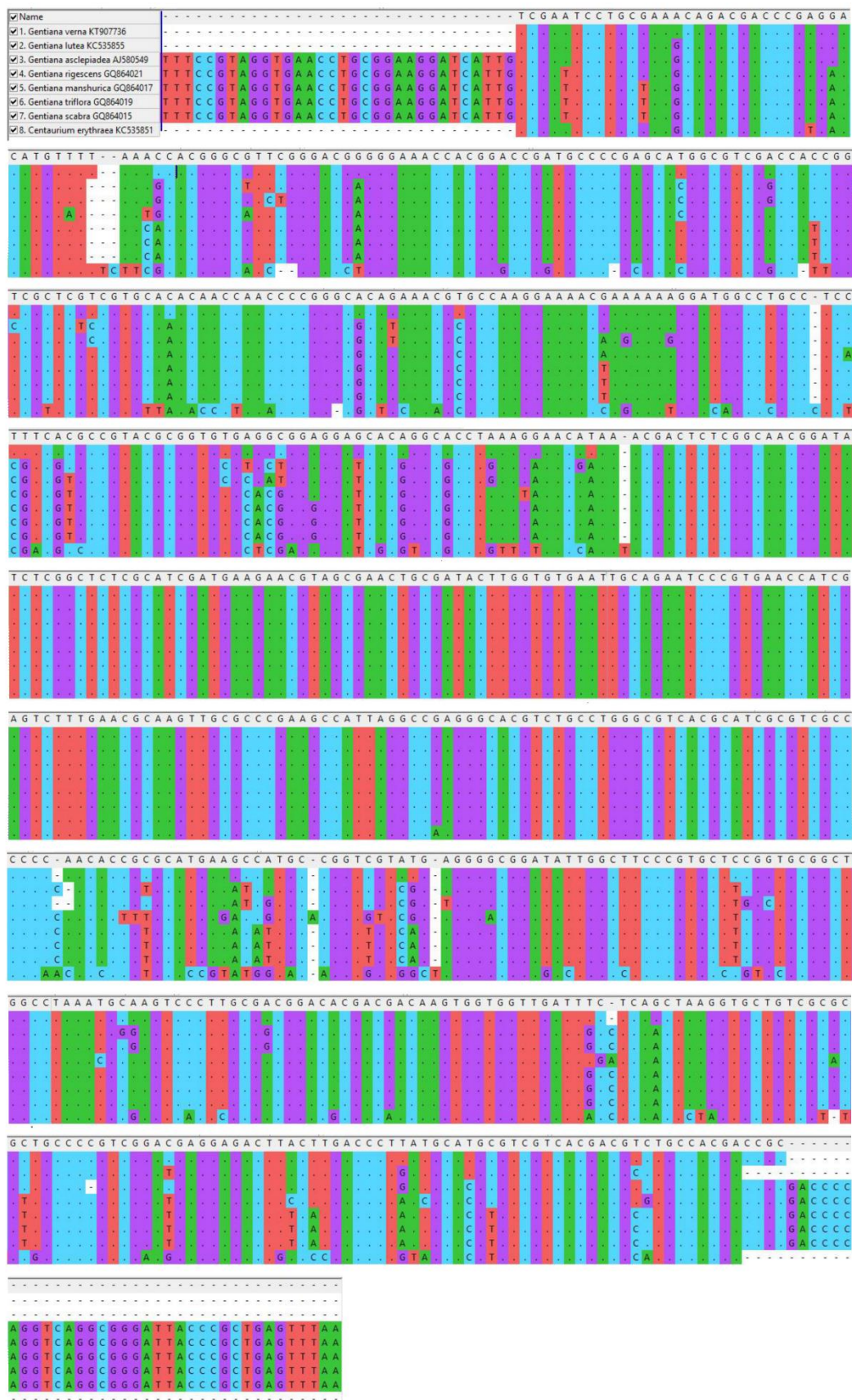
- 2010 Jan 7;5(1).
31. Poczai P, Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: Problems and prospects. Vol. 37, Molecular Biology Reports. 2010.
 32. Coleman AW. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. Trends Genet. 2003;19(7).
 33. Coleman AW. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. Vol. 50, Molecular Phylogenetics and Evolution. 2009.
 34. Coleman AW. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. Vol. 35, Nucleic Acids Research. 2007.
 35. Yuan YM, Küpfer P, Doyle JJ. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. Am J Bot. 1996;83(5).
 36. Gielly L, Taberlet P. A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast trnL (UAA) intron sequences. Bot J Linn Soc. 1996;120(1).
 37. Yuan YM, Küpfer P. The monophyly and rapid evolution of *Gentiana* sect. *Chondrophyllae* Bunge s.l. (Gentianaceae): Evidence from the nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. Bot J Linn Soc. 1997;123(1).
 38. Mishiba KI, Yamane K, Nakatsuka T, Nakano Y, Yamamura S, Abe J, et al. Genetic relationships in the genus *Gentiana* based on chloroplast DNA sequence data and nuclear DNA content. Breed Sci. 2009;59(2).
 39. Zhang XL, Wang YJ, Ge XJ, Yuan YM, Yang HL, Liu JQ. Molecular phylogeny and biogeography of *Gentiana* sect. *Cruciata* (Gentianaceae) based on four chloroplast DNA datasets. Taxon. 2009;58(3).
 40. Мельник В.М., Андреев І.О., Спірідонова К.В. КВА. Рестрикційне картування та варіабельність 18S-25S рибосомних генів деяких видів роду *Gentiana* L. Цитология и генетика. 2003;37(5):65–71.

ДОДАТКИ

Додаток А1

(вирівняні послідовності МГС 5S рДНК досліджуваних видів)

✓Name	CTAGGATGGGTGACCCCTGGGAAGTCCTCGTGTGACCCCT - - - - - CTTTTTGCCAT
✓1. Gentiana triflora 457 bp	
✓2. Gentiana manshurica 457 bp	
✓3. Gentiana scabra 456 bp	
✓4. Gentiana lutea(500bp)clone 1 492 bp	
✓5. Gentiana asclepiadea(500bp)clone 1a	
✓6. Gentiana verna subsp pontica 376 bp	
✓7. Gentiana rigescens 261 bp	
✓8. Centaurium erythraea 528 bp	
TTTTTCGTTCTCTGCTCTAGGATGGGTGACCCCTGGGAAGTCCTCGTGTGACCCCT - - - - - CTTTTTGCCAT	
TCTTCTTA - TTCACCTCATTGTCGCTTT - - - - - TTCACGTGTCATATCGTCGCCTCTAC - - - - - GTCG - - - - - TTGCGGTTCC	
CAC - - - - - GCGCTCC - - - - - TCTCACAGCACAAATGCGCGG - - - - - GATCCGATAAAAACTCGGAATCCAATAAAAAATC	
CCAAGATAAA - TGAAAACGGAAATTTCTTGACAGATTACCCGAATTCGGAATCAAACATATTCGTAATCGGATC	
TTTTCTGCGTACGCAAT - - - - - TAAAATAATAAAAAACATGAAAAA - - - - - CG - - - - - TGCC - - - - - AGTCC	
- - - - - GTCGTGCTCGACGTTCCCTCGCCCA - - - - - CGGTCCGC - - - - - GGCTCTC - - - - - AATGCTCAAATACATACGAA - - - - -	
- - - - - CGCATCCTCTTAA - - - - - CGGG - - - - -	



(вирівняні послідовності ВТС2 досліджуваних видів)

[illegible]

G C T G G C C T A A A T G C A A G T C C C T T G C G A C G G A C A C G A C G A C A A G T G G T G G T

[illegible][illegible]