

В.М. МЕЛЬНИК, І.О. АНДРЄЄВ,
К.В. СПІРІДОНОВА, В.А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

РЕСТРИКЦІЙНЕ КАРТУВАННЯ ТА ВАРИАБЕЛЬНІСТЬ 18S–25S РІБОСОМНИХ ГЕНІВ ДЕЯКИХ ВІДІВ РОДУ *GENTIANA* L.



Здійснено картування генів рРНК за деякими ендонуклеазами рестрикції у чотирьох видів роду *Gentiana* L. методом блот-гібридизації. Виявлено такі особливості структурного організації рДНК тирличів: 1) міжвидова та внутрігеномна варіабельність за розміром; 2) консервативність транскрибованої ділянки; 3) мінливість нетранскрибованого спейсера за розміром та розташуванням *HindIII*-сайту; 4) міжвидова варіабельність за копійністю. Шляхом порівняльного аналізу рестрикційних карт встановлено подібність тирличів до інших рослин за локалізацією рестрикційних сайтів в транскрибованій ділянці рДНК.

© В.М. МЕЛЬНИК, І.О. АНДРЄЄВ, К.В. СПІРІДОНОВА,
В.А. КУНАХ, 2003

Вступ. Рід *Gentiana* — це складний у систематичному відношенні таксон, чим і пояснюється відсутність загальновизнаної системи даного роду ось уже протягом трьох століть його дослідження. Остаточно не вирішеними залишаються питання обсягу роду *Gentiana*, систематичної цінності ознак, ступеня їх мінливості та таксономічного статусу окремих поліморфних видів. У зв'язку з цим не існує єдиного погляду на проблеми еволюції, філогенії та генезису в межах роду [1, 2]. Для з'ясування деяких питань еволюції тирличів на мінливості були вибрані види *G. asclepiadea*, *G. acaulis*, *G. punctata*, *G. lutea*, які відносяться в межах роду до різних секцій та відрізняються як за морфологією, анатомією та умовами зростання, так і за часом виникнення в процесі еволюції.

Останнім часом для систематизації рослин та встановлення філогенетичних взаємозв'язків дедалі частіше використовуються молекулярно-генетичні маркери. Одними з таких маркерів є гени, які кодують рибосомні РНК [3]. Ядерні гени 18S–25S рРНК рослин належать до класу повторюваних послідовностей і представлені великою кількістю копій — від 500 до 30 000. Численні копії генів рРНК розміщені в одному чи кількох локусах геному у вигляді тандемно організованих повторів. Кожна структурна одиниця такого повтору включає нетранскрибований спейсер, ген 18S рРНК, внутрішній транскрибований спейсер I (BTC 1), ген 5,8S рРНК, BTC 2, ген 25S рРНК. Кодуючі частини сусідніх рибосомних повторів розділяє ділянка нетранскрибованого спейсера (HTC), яка несе сигнали ініціації і термінації транскрипції. До складу HTC можуть входити декілька різновидів коротких субповторюваних одиниць, довжина яких складає 20–300 п.н. HTC є найбільш варіабельною частиною рибосомного повтору. Молекулярною основою гетерогенності HTC є різниця у кількості субповторів, що формують окремі ділянки спейсера і еволюціонують із значною швидкістю [4–8].

Особливості будови генів рРНК — багатокопійність, кластерна організація, висока консервативність кодуючих ділянок і варіабельність спейсерних послідовностей, а також наявність механізмів, що забезпечують узгоджену еволюцію повторів рДНК всередині кластера, роблять їх зручною моделлю для з'ясування питань екології, популяційної генетики, селекції і систематики [4].

Метою даної роботи було картування сайтів пізнавання для деяких рестриктаз в ядерних генах 18S–25S рРНК чотирьох представників роду

Gentiana L. та подальше їх порівняння між собою для встановлення особливостей мінливості рДНК тирличів.

Матеріали та методи. У роботі використовували сумарну ДНК 4–5-річних рослин різних видів роду *Gentiana* L.: *G. lutea*, *G. punctata* (зібрані на г. Пожижевська, Чорногірський хребет Карпат), *G. asclepiadea* (пол. Рогнеска, Чорногірський хребет Карпат), *G. acaulis* (г. Туркул, Чорногірський хребет Карпат). ДНК виділяли з молодих листків за методом [9]. Гідроліз ДНК проводили сайт-специфічними ендонуклеазами BamHI, EcoRI, HindIII протягом 4 год згідно з інструкцією фірми-виробника («MBI Fermentas», Литва). Продукти гідролізу розділяли горизонтальним гель-електрофорезом в 1%-ному агарозному гелі («Serva», США), в $0.5 \times$ TBE буфері при градієнті напруги 2 В/см упродовж 12 год. Перенос ДНК на нейлонову мембрانу здійснювали методом капілярного переносу по Саузерну, використовуючи як несучий буфер $10 \times$ SSPE [10].

У ролі зондів для blot-гібридизації використовували повний ядерний рибосомний ген пшениці

ниці (клон pTA71) [11] довжиною 9 т.п.н. та його фрагменти: EcoRI–BamHI фрагмент розміром 4,2 т.п.н., що містить нетранскрибований міжгеннний спейсер; BamHI-фрагмент довжиною 3,6 т.п.н., що містить транскрибовану ділянку рДНК (включає 18S, BTC 1, 5,8S, BTC 2, 25S). Зонди мітили $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP методом розсіяної затравки. Блот-гібридизацію проводили за методикою [10].

Результати досліджень та їх обговорення. Попередній рестрикційний аналіз геномної ДНК представників роду Тирлич з використанням різних сайт-специфічних ендонуклеаз із подальшою гібридизацією з 18S–25S рДНК показав, що найбільш придатними для дослідження цієї послідовності є рестриктази HindIII, BamHI, EcoRI, оскільки в результаті гідролізу цими ферментами утворюється невелика кількість чітких, відмінних за розміром фрагментів.

Результати гібридизації ДНК *G. acaulis*, гідролізованої цими рестриктазами, з повним рибосомним повтором пшениці та його окремими ділянками представлені на рис. 1. З отриманих даних видно, що послідовність рДНК *G. acaulis*

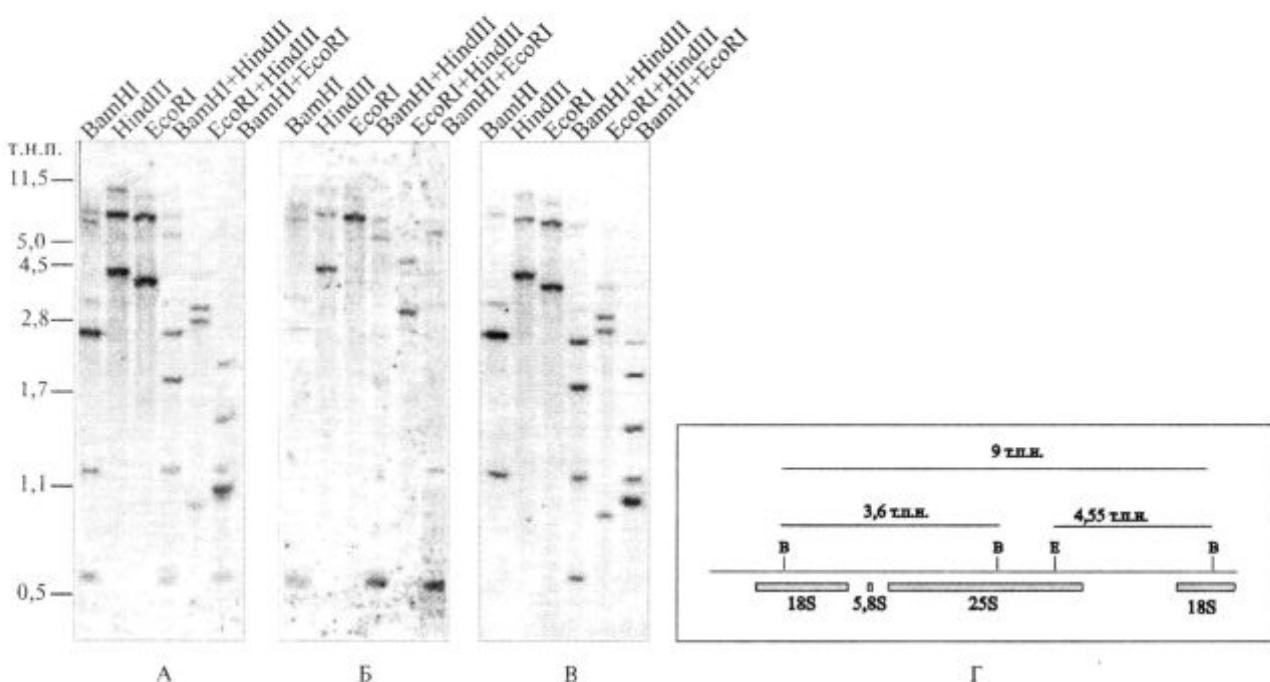


Рис. 1. Картування 18S–25S рДНК *G.acaulis*. ДНК *G.acaulis*, гідролізовану ендонуклеазами рестрикції відповідно до позначок на рисунку, гібридизували з повним повтором рДНК пшениці (А) або з його фрагментами: 3,6 т.п.н. фрагментом транскрибованої ділянки (Б) та 4,55 т.п.н. фрагментом, що містить НТС (В). Схематичне розташування послідовностей, використаних у ролі зондів для гібридизації, подане на панелі Г

розщеплюється рестриктазою BamHI з утворенням шести фрагментів в діапазоні від 0,6 до 7,2 т.п.н.; HindIII — трьох фрагментів розміром 4,0; 7,0 та 11,0 т.п.н. і EcoRI — трьох фрагментів розміром 3,8; 6,9 та 10,7 т.п.н.

Розглядаючи HindIII-рестрикційні фрагменти, слід відзначити, що 11,0 т.п.н. мінорний фрагмент є сумаю двох мажорних фрагментів розміром 4,0 та 7,0 т.п.н., отже він є продуктом неповного гідролізу. Оцінюючи високомолекулярні продукти гідролізу рДНК, можна бачити, що цей мінорний фрагмент має найбільший розмір і, очевидно, відповідає повному повтору рДНК *G. acaulis*, який, таким чином, містить два сайти пізnavання HindIII-рестриктази. Як свідчать результати гібридизації з окремими ділянками рДНК (рис. 1, Б, В), один з цих сайтів розташований в транскрибованій ділянці, а інший в НТС, оскільки обидва утворені при їх розщепленні фрагменти гібридизуються з однаковою інтенсивністю із різними частинами рДНК пшениці.

У випадку EcoRI-гідролізу спостерігається набір фрагментів, подібний до HindIII-рестрикцій, що вказує на існування в послідовності рДНК *G. acaulis* хоча б двух EcoRI-сайтів, розщеплення за якими приводить до утворення двох мажорних фрагментів. Однак сумарний розмір мажорних EcoRI-фрагментів дещо менший від 11,0 т.п.н., що свідчить про наявність додаткових близько локалізованих сайтів даної ендонуклеази, низькомолекулярні продукти розщеплення якої не виявляються в даних умовах розділення. За результатами гібридизації з різними ділянками рДНК (рис. 1, Б, В) встановлено, що фрагмент розміром 6,9 т.п.н. містить ділянку НТС та частину транскрибованого регіону повтору, тоді як фрагмент розміром 3,8 т.п.н. захоплює лише транскрибовану ділянку.

При гідролізі рДНК *G. acaulis* BamHI-рестриктазою виявляється принаймні шість фрагментів, сумарний розмір яких значно перевищує 11,0 т.п.н. Це вказує на те, що частина з цих фрагментів, а саме мінорний фрагмент розміром 3,2 т.п.н. та один з фрагментів в зоні 6–7,5 т.п.н., є результатом неповного гідролізу ДНК. Аналіз результатів гібридизації з фрагментами рДНК (рис. 1, Б, В) показав, що фрагменти розміром 1,2; 2,6; 3,2 та 7,2 т.п.н. містять різні частини кодуючої ділянки рДНК, а різні ділянки НТС входять до складу фрагментів розміром 0,6; 3,2; 6,0 та 7,2

т.п.н. Виходячи з цього, ми вважаємо, що 3,2 т.п.н. фрагмент складається з фрагментів розміром 2,6 та 0,6 т.п.н., а 7,2 т.п.н. фрагмент — відповідно з 6,0 та 1,2 т.п.н. фрагментів. Нуклеотиди у складі BamHI-сайтів, локалізованих в цих ділянках, очевидно модифіковані, що й призводить до неповного гідролізу.

Аналіз продуктів подвійного гідролізу комбінаціями рестриктаз HindIII та BamHI дозволив з'ясувати, що один з HindIII-сайтів в транскрибованій частині рДНК розташований в області повтору, яка охоплюється BamHI-фрагментами розміром 2,6 та 3,2 т.п.н., при його розщепленні відбувається їх вкорочення на 0,6 т.п.н. (рис. 1, В, дор. 4). Гідроліз другого HindIII-сайта призводить до розщеплення BamHI-фрагментів НТС розміром 6,0 та 7,2 т.п.н. на фрагменти розміром 0,6 т.п.н. та 5,4 і 6,6 т.п.н. відповідно (рис. 1, Б, дор. 4).

HindIII-гідроліз приводить до розщеплення EcoRI-фрагмента транскрибованої ділянки довжиною 3,8 т.п.н. на фрагменти розміром близько 2,8 та 0,9 т.п.н. Другий EcoRI-фрагмент розміром близько 7,0 т.п.н., який охоплює зону НТС та частину транскрибованої ділянки, розщеплюється з утворенням 2,9 та 4,1 т.п.н. фрагментів, з яких тільки перший гібридизується з 3,6 т.п.н. фрагментом рДНК пшениці (рис. 1, В, дор. 5).

Подвійний гідроліз EcoRI + BamHI рДНК *G. acaulis* виявив, що 6,0 та 7,2 т.п.н. BamHI-фрагменти, які включають регіон НТС, розщеплюються EcoRI-рестриктазою до фрагментів розміром 5,0 т.п.н. та 1,0 і 2,2 т.п.н. відповідно. Слід зазначити, що фрагмент розміром 1,0 т.п.н. не гібридизується з НТС та 3,6 т.п.н. фрагментом рДНК пшениці, отже він відповідає BamHI/EcoRI фрагменту рДНК пшениці, який окремо не використовувався для гібридизації. BamHI-фрагмент транскрибованої області розміром 2,6 т.п.н. розщеплюється на 1,5 та 1,1 т.п.н. фрагменти. В цілому, з результатів подвійних гідролізів видно, що 0,6 та 1,2 т.п.н. BamHI фрагменти не містять сайтів пізnavання для інших використаних нами рестриктаз.

Подібні дослідження були проведені для представників інших видів роду Тирлич — *G. lutea*, *G. punctata*, *G. asclepiadea*. На основі отриманих результатів були побудовані карти рДНК цих видів (рис. 2). Загалом, результати картування показали значну консервативність кодуючих ділянок 18S–25S генів рРНК у досліджуваних

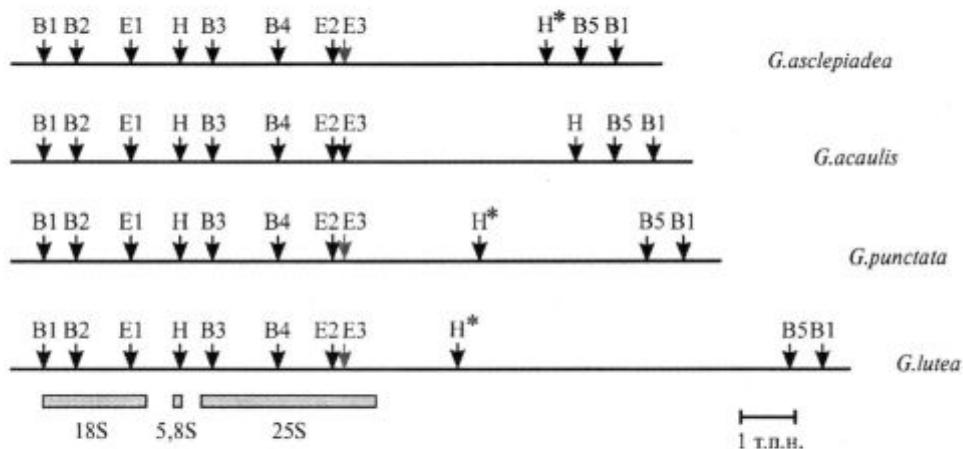


Рис. 2. Міжвидова варіабельність повтору рДНК за довжиною та локалізацією додаткового HindIII-сайта у тирличів: В — BamHI сайт; Е — EcoRI сайт; Н — HindIII сайт. *Частково метильований сайт. Положення сайта E3 в *G. asclepiadea*, *G. punctata*, *G. lutea* вказано за припущенням, аналогічно до *G. acaulis*

видів. Поряд з цим виявлено міжвидові відмінності рДНК за розміром, які зумовлені варіабельністю ділянки НТС, а також за локалізацією в НТС сайта HindIII ендонуклеази.

Найменша довжина рибосомного повтору характерна для *G. asclepiadea*. Розмір повної повторюваної рибосомної одиниці у цього виду складає 10,5 т.п.н. В *G. acaulis* довжина повтору рДНК становить 11,0 т.п.н. Кількість послідовностей рДНК у геномі *G. acaulis* по відношенню до сумарної ДНК значно менша в порівнянні з іншими видами. В *G. punctata* довжина рибосомного повтору становить 11,8 т.п.н. В *G. lutea* виявлено рибосомні повтори розміром приблизно 13,0; 13,7 і 14,5 т.п.н., що свідчить про внутрігеномний поліморфізм повторів за довжиною.

Щодо HindIII-сайта, розташованого в ділянці НТС, виявлено, що в *G. acaulis* він розташований на відстані ~1 т.п.н. від початку ділянки, яка кодує 18S рРНК, і розщеплюється майже у всіх рибосомних повторів. В *G. asclepiadea* цей сайт піддається гідролізу лише в частині повторів і розташований по відношенню до 18S рДНК так само, як і в *G. acaulis*. У *G. punctata* і *G. lutea* HindIII-сайт в НТС гідролізується лише у мінорній частці повторів, при цьому сайт в порівнянні з двома попередніми видами знаходиться більше до кінця гена 25S рРНК.

Таким чином, у представників роду *Gentiana* нами виявлені такі особливості структурної організації рДНК: 1) міжвидова та внутрігеномна варіабельність за розміром; 2) консервативність

транскрибованої ділянки; 3) мінливість нетранскрибованого спейсера за розміром та розташуванням HindIII сайта; 4) міжвидова варіабельність за копійністю.

Варіабельність за розміром НТС була виявлена у трьох видів роду *Nicotiana* [6]. Шляхом секвенування даної ділянки рДНК автори показали, що різниця у довжині НТС зумовлена різною кількістю субповторюваних елементів, що входять до його складу. Знайдено, що довжина НТС може варіювати в різних особин одnego виду і навіть всередині геному одної особини [5]. При дослідженні рДНК у одного з видів тирличів, а саме *G. lutea*, нами було виявлено внутрігеномний поліморфізм повторів за довжиною. Виходячи з того, що гетерогенність повторів обумовлена відмінностями їх розмірів на дискретну величину (700–800 п.н.), можна припустити, що в даному випадку молекулярною основою виявленої гетерогенності є різниця в числі субповторів, які формують окремі ділянки НТС.

Раніше вважалось, що поліморфізм ділянки НТС не має істотного функціонального значення, однак недавно на рослинах було переконливо показано, що кількість деяких субповторів у передпромоторній області може впливати на інтенсивність експресії генів рРНК [5, 6]. Наприклад, у міжвидових гіbridів злаків рДНК з довшим спейсером домінує над рДНК, яка має коротший НТС [5]. Вважається, що це викликано зв'язуванням факторів транскрипції, які присутні в обмеженій кількості, переважно з довгими НТС, що

містять більше субповторів-енхансерів. Нестача факторів транскрипції призводить до інактивації ядерця одного з батьків внаслідок конденсації хроматину, яка в свою чергу зумовлена диференціальним метилюванням цитозину та ацетилюванням гістонів, як це було показано для гібридів *Triticum-Secale* [5].

Таким чином, загальним напрямком еволюції рДНК у рослин є збільшення довжини рибосомного повтору за рахунок збільшення розміру НТС. Окрім того, у більшості еукаріот у процесі еволюції спостерігається «уніфікація» довжин повторів генів рРНК у межах кластера. Процеси, які лежать в основі такої узгодженості еволюції рДНК, до кінця ще не з'ясовані, однак вважають, що вона може бути зумовлена кросинговером і/або генною конверсією [5]. При аналізі отриманих результатів з-поміж досліджуваних видів *Gentiana* вирізняється *G. lutea*. Даний вид характеризується морфологічними ознаками рослини, властивими для предкових видів тирличів. На цій підставі деякі автори виділяють його в межах роду в окрему секцію і вважають найбільш давнім за походженням [1, 2]. Однак, незважаючи на значну консервативність морфологічних ознак, найбільша довжина повтору рДНК наводить на думку про більш пізнє формування геному *G. lutea* в порівнянні з молодшими в еволюційному плані *G. asclepiadea* та *G. acaulis*. На те, що геном цього виду знаходить ще у процесі формування, вказує і властива лише для *G. lutea* гетерогенність рибосомних повторів за довжиною. Найближчим до *G. lutea* за довжиною НТС і локалізацією в ньому HindIII-сайта є *G. punctata*, який подібний до цього виду також за морфологічними та анатомічними ознаками [1, 2, 12] і спектром рестрикційних фрагментів ДНК [13]. Однак для більш детальної характеристики еволюції геномів різних видів тирличів потрібні подальші дослідження із застосуванням більшої кількості молекулярних маркерів.

У досліджених видів тирличів було виявлено відмінності в характері розщеплення та локалізації HindIII-сайта в нетранскрибованому спейсері рДНК. Характер розщеплення може змінюватися внаслідок модифікації нуклеотидних основ (наприклад, метилюванням) в сайті пізнавання. Такі модифікації розглядаються як можливий регуляторний механізм експресії генів (в тому числі і рРНК) [4, 14]. Крім того, процес метилю-

вання-деметилювання цитозинових залишків в молекулах ДНК є одним із можливих шляхів виникнення точкових мутацій шляхом заміни цитозину на тимін. Виявлено в тирличів різниця в характері розщеплення НТС по HindIII-сайту може бути обумовлена обома цими явищами. У тирличів простежується взаємозв'язок між модифікацією HindIII-сайта та копійністю рДНК. Наприклад, у *G. acaulis* спостерігається найменша копійність рДНК серед досліджуваних видів, при цьому значна частка повторів гідролізується HindIII-рестриктазою в НТС. В *G. asclepiadea* у HindIII-сайті гідролізується біля половини, а у *G. lutea* і *G. punctata* — лише незначна частина НТС, поряд з цим копійність повторів рДНК у цих видів вища. Цей взаємозв'язок може бути обумовлений відмінностями в механізмах регуляції кількості повторів рДНК, що експресуються. У випадку *G. acaulis* це зниження копійності генів, у інших видів — їх інактивація внаслідок модифікації і наступної гетерохроматинізації ДНК. Іншою причиною може бути редукція неактивних повторів рДНК в геномі *G. acaulis*. В цілому ж модифікації HindIII-сайта в НТС можуть бути пов'язані з надлишковим пулом повторів рДНК в геномах *G. lutea*, *G. punctata* і *G. asclepiadea*.

Порівняльний аналіз рестрикційних карт генів 18S–25S рРНК тирличів та інших рослин [11, 15] (рис. 3) показав подібність локалізації сайтів впізнавання для HindIII, BamHI і EcoRI ендонуклеаз у транскрибованій частині рДНК. Так, місце розташування двох EcoRI-сайтів у тирличів таке ж, як і в інших дводольних рослин — гороху і гарбуза, тоді як в однодольних (пшениця, ячмінь та кукурудза) перший з них відсутній. Окрім того, у видів *Gentiana* наявний ще один EcoRI-сайт, розташований в гені 25S рРНК і характерний лише для них. У тирличів, як і в гарбуза, у першому внутрішньому транскрибованому спейсері наявний HindIII-сайт, відсутній в інших рослин. Значно більша варіабельність спостерігається за BamHI-сайтами (B1–4 на рис. 3). Так, в рДНК тирличів перший сайт (B1) подібно до рослин, карти яких представлені на рис. 3, розташований на початку гена 18S рРНК. Другий сайт (B2) локалізований всередині гена 18S рРНК і окрім тирличів наявний у гороху, пшениці, ячменю, кукурудзи і теосинте, але відсутній у гарбуза. Слід зазначити, що на відміну від інших рослин, у тирличів не вся рДНК гідролізується в цьому

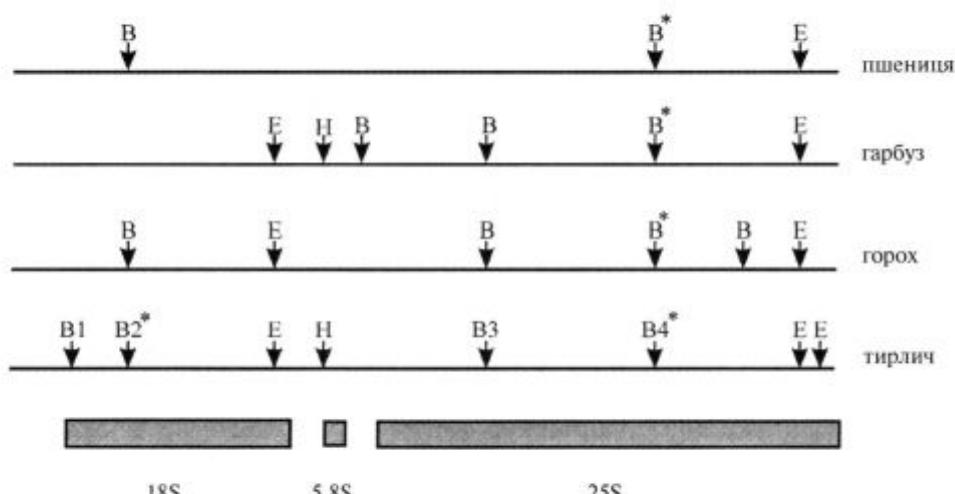


Рис. 3. Порівняльний аналіз локалізації сайтів впізнавання для HindIII (H), BamHI (B) і EcoRI (E) ендонуклеаз рестрикції в транскрибованій частині рибосомного повтору різних рослин. * Частково метильований сайт. Карти рДНК пшениці, гарбуза, гороху наведені за [15]

сайті, що можна пояснити частковим метилюванням цитозину у його складі. За розташуванням в рДНК третього сайта (B3) тирличі подібні до інших дводольних рослин (гарбуза і гороху) і відрізняються від однодольних, в яких він відсутній. Четвертий сайт (B4) характерний для всіх розглянутих рослин. Його особливістю є те, що приблизно половина рибосомних повторів у цьому сайті не гідролізується в результаті метилювання як у тирличів, так і в інших описаних вище рослин [15].

Отже гени рРНК тирличів виявляють значну подібність до генів в інших рослин за локалізацією HindIII, BamHI і EcoRI сайтів рестрикції, причому більша спорідненість спостерігається з дводольними рослинами, до класу яких відносяться і тирличі. Така подібність зумовлена високою консервативністю кодуючих ділянок генів рРНК. Як відомо, послідовності, що кодують рРНК, є одними з найбільш консервативних у еукаріотів [4–8]. Це зумовлено стабілізуючим добором, направленим на збереження функціональної структури рибосом. Результати наших досліджень узгоджуються з літературними даними, що різні ділянки повтору рДНК істотно відрізняються за швидкістю молекулярної еволюції. У представників роду *Gentiana*, подібно до інших рослин, найбільш швидко еволюціонує НТС, з мінливістю якого пов'язана варіабельність рибосомних повторів.

Висновки. З'ясовано деякі особливості структурної організації рДНК у тирличів. Гени 18S–25S

рРНК видів роду *Gentiana* характеризуються міжвидовими відмінностями за розміром повтору та локалізацією сайтів деяких рестриктаз. Ці відмінності зумовлені варіабельністю нетранскрибованих спейсерних ділянок, в той час як транскрибовані ділянки повторів рДНК різних видів виявилися подібними за розташуванням сайтів рестрикції та довжиною. Виявлено подібність видів роду *Gentiana* L. до інших рослин за локалізацією рестрикційних сайтів у транскрибованій ділянці рДНК, при цьому більша спорідненість спостерігається з дводольними рослинами, до класу яких вони належать.

Автори висловлюють подяку канд. біол. наук О.Г. Алхімовій (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України) за люб'язно надану плазмідну конструкцію з рДНК пшениці. Робота виконувалась за часткової фінансової підтримки наукової програми НАН України «Фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні основи функціонування живих систем і розробка принципів керування ними».

SUMMARY. Mapping of rRNA genes in four species of *Gentiana* genus has been carried out by blot-hybridization method using some restriction endonucleases. The following characteristics of *Gentiana* rDNA structural organization have been revealed: 1) interspecific and intragenomic variability of the length of ribosomal repeats; 2) conservativity of the transcribed region; 3) variability of the length and location of Hind-III site in non-transcribed spacer; 4) interspecific variability of the number of copies. Comparative analysis of the

constructed restriction maps of *Gentiana* species and some other plants revealed the similarity of restriction site location in the transcribed DNA region.

РЕЗЮМЕ. Методом blot-гибридизации с использованием некоторых эндонуклеаз рестрикции осуществлено картирование генов рРНК у четырех видов рода *Gentiana* L. Выявлены следующие особенности структурной организации рДНК горечавок: 1) межвидовая и внутригеномная вариабельность рибосомных повторов по размеру; 2) консервативность транскрибуируемого участка; 3) изменчивость нетранскрибуируемого спейсера по размеру и расположению HindIII-сайта; 4) межвидовая вариабельность по копийности. Сравнительным анализом построенных рестрикционных карт видов *Gentiana* и других растений показано их сходство по локализации сайтов рестрикции в транскрибуируемом участке рДНК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шиян (Драпайлло) Н.М., Савицька В.Д. Паліноморфологія видів роду *Gentiana* s.l. (*Gentianaceae*) флори України // Укр. бот. журн. — 1994. — 51, № 5. — С. 47–56.
2. Драпайлло Н.М. Рід *Gentiana* s.l. флори України : Автограф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 1995. — 24 с.
3. Антонов А.С. Основы геносистематики высших растений. — М.: МАИК «Наука/Интерperiодика», 2000. — 135 с.
4. Сидоренко А.П., Созинов А.А. Структурный полиморфизм кластера рибосомальных генов растений и перспективы его практического использования // Цитология и генетика. — 1998. — 32, № 4. — С. 97–104.
5. Куприянова Н.С. Консервативность и изменчивость рибосомной ДНК зукариот // Молекуляр. биология. — 2000. — 34, № 5. — С. 753–765.
6. Волков Р.А., Панчук І.І., Борисюк Л.Г., Борисюк М.В. рДНК рослин: організація, еволюція, застосування // Цитологія і генетика. — 2003. — 37, № 1. — С. 72–78.
7. Rogers S.O., Bendich A.J. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer // Plant Mol. Biol. — 1987. — 9. — P. 509–520.
8. Sollner-Webb B., Tyc K., Steitz J. Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Synthesis / Eds R. Zimmerman, A. Dahlberg. — New York : CRC Press, 1995.
9. Rogers I., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. — 1985. — 5. — P. 69–76.
10. Маниатис Т., Фрич З., Сэмбрюк Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
11. Gerlach W.L., Bedbrook J.R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley // Nucl. Acids Res. — 1979. — 7, № 7. — P. 1869–1879.
12. Прокопів А.И. О путях становления системы покровных тканей корня *Gentiana* L. (*Gentianaceae*) в онтогенезе и филогенезе // Филогенія і систематика растений. — М.: Наука, 1991. — С. 85–87.
13. Мельник В.М., Спірідонова К.В., Андрєєв І.О., Страшнюк Н.М., Кунах В.А. Дослідження геномів деяких видів роду *Gentiana* в природі та в культурі клітин *in vitro* // Цитологія і генетика. — 2002. — 36, № 6. — С. 28–34.
14. Ashapkin V.V., Antoniv T.T., Vanyushin B.F. Methylation dependent binding of wheat nuclear proteins to the promoter region of ribosomal RNA genes // Gene. — 1995. — 157. — P. 273–277.
15. Jorgensen R.A., Cuellar R.E., Thompson W.F., Kavanagh T.A. Structure and variation in ribosomal RNA genes of pea // Plant Mol. Biol. — 1987. — 8. — P. 3–12.

Надійшла 10.06.03