# 5S РИБОСОМНА ДНК КВІТКОВИХ РОСЛИН



Міністерство освіти і науки України Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

# 5S РИБОСОМНА ДНК КВІТКОВИХ РОСЛИН

Монографія

За редакцією професора Р.А. Волкова



Чернівці Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича 2021

#### УДК 582.5/.9:575.86 П 999

#### Друкується за ухвалою Вченої ради Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича (протокол № 13 від 21 грудня 2020 року)

#### Рецензенти:

**Блюм Я.Б.,** академік НАН України, доктор біологічних наук, професор, директор Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України; **Дробик Н.М.,** доктор біологічних наук, професор, декан хіміко-біологічного факультету Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка;

*Ходосовцев О.Є.*, доктор біологічних наук, професор, заслужений працівник освіти України, завідувач лабораторії біорізноманіття та екологічного моніторингу Херсонського державного університету.

П 999 **58** рибосомна ДНК квіткових рослин : монографія / за ред.. Р.А. Волкова. – Чернівці : Чернівец. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2021. – 168 с.

ISBN 978-966-423-678-9

Монографія присвячена організації ділянок геному, які кодують 5S рибосомну РНК (5S рДНК) у покритонасінних. Наведено огляд літературних джерел та представлено оригінальні результати стосовно будови, молекулярної еволюцію та використання у таксономічних дослідженнях 5S рДНК одно- та дводольних рослин.

Книга розрахована на фахівців у галузі генетики, молекулярної біології, таксономії, викладачів, аспірантів та студентів старших курсів біологічних факультетів університетів.

УДК 582.5/.9:575.86

© Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, 2021

ISBN 978-966-423-678-9

© Волков Р.А.(редактор), 2021

#### ВСТУП

Характерною рисою геномів еукаріотичних організмів є наявність фракції повторюваних послідовностей. Особливо багато таких послідовностей знайдено у великих геномах вищих рослин. Значна частина повторюваних послідовностей являє собою різноманітні транспозони, які дисперговані по всьому геному. Ці послідовності не мають ніяких функцій, вони не є життєво необхідними для клітини і, відповідно, еволюціонують з великою швидкістю: суттєва різниця у наборах послідовностей цього класу часто спостерігається навіть між близько спорідненими видами. Висока еволюційна характерна мінливість i ЛЛЯ іншої групи повторюваних послідовностей – сателітних ДНК.

До класу повторюваних послідовностей також належать ділянки, які кодують рибосомну РНК (або рДНК). На відміну від більшості повторюваних послідовностей, функціональна активність рДНК є необхідною для клітини, забезпечуючи синтез рРНК – обов'язкового компонента рибосом. Відповідно, рДНК присутня в геномах усіх еукаріотів, що робить її універсальною моделлю для вивчення молекулярної еволюції повторюваних послідовностей у різних таксонів. Розрізняють 35S та 5S рДНК, тобто ділянки, які кодують 5.8S, 18S і 25S рРНК та 5S рРНК, відповідно. У переважної більшості рослин 35S та 5S рДНК знаходяться в окремих локусах, розташованих на одній або різних хромосомах, тоді як їх колокалізація зустрічається як виключення.

До складу 35S рДНК входять ділянки, які кодують 18S, 5.8S та 25S рРНК і завжди розташовані у вказаному порядку в напрямку транскрипції. Кодувальні ділянки для 18S та 5.8S рРНК розділяє спейсер ITS1 (internal transcribed spacer 1), а для 5.8S та 25S рРНК – ITS2. Перед кодувальною ділянкою для 18S рРНК знаходиться 5' ETS (external transcribed spacer), який починається від сайту

TIS (transcription initiation site), а після кодувальної ділянки для 25S pPHK -3' ETS, якій закінчується на сайті TTS (transcription termination site).

Як і 35S, 5S рДНК має універсальну тандемну будову в усіх еукаріот. Повторювана одиниця 5S рДНК складаються з еволюційно консервативної кодувальної ділянки та мінливого IGS (intergenic spacer).

Хоча численні копії повторів рДНК співіснують в одному і тому ж геномі, вони, як правило, майже однакові. Вважається, що це є наслідком процесу гомогенізації, тобто окремі копії рДНК еволюціонують не самостійно, а узгоджено.

Послідовності рДНК 3 успіхом використовуються y дослідженнях. Зокрема, ITS1 філогенетичних ITS2, які та еволюціонують з високою швидкістю, широко використовуються у молекулярній систематиці таксонів низького рангу. Завдяки цьому на сьогодні ITS1 та ITS2 є найбільш широко сиквенованими еукаріотичних 3 ділянками геномів. високою швидкістю змінюються й ділянки IGS у складі 5S рДНК, що робить їх привабливим інструментом молекулярної філогенетики. Проте, на противагу ITS1 та ITS2, організація IGS у рослин все ще залишається дослідженою лише фрагментарно.

У цій монографії наведено результати українських дослідників, які доповнюють існуючі уявлення щодо молекулярної будови, еволюції та таксономічного використання 5S рДНК у різних групах одно- та дводольних рослин.

Р.А. Волков

# ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ У ФІЛОГЕНЕТИЦІ РОСЛИН

# О.О. Іщенко, Р.А. Волков

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

### Молекулярна організація 5S рДНК

Характерною особливістю геномів насінних рослин є високий вміст повторюваних послідовностей (Kubis et al., 1998; Lee, Kim, 2014). Значну частину цієї фракції геному становлять транспозони та сателітні ДНК, які здебільше не виконують певних функцій та еволюціонують з великою швидкістю. Крім того, до середньо повторюваних послідовностей належать ділянки, які кодують 5S та 45S (18S+5.8S+26S) рРНК (так звана рДНК). На відміну від більшості повторюваних послідовностей, рДНК присутня у геномах всіх еукаріотичних організмів, а її функція добре відома.

У еукаріот 5S рДНК представлена сотнями або тисячами копій повторюваних одиниць (повторів), які організовані тандемно, за принципом «голова-хвіст» та утворюють кластери, розташовані на одній чи кількох хромосомах (Cloix et al., 2000; Garcia et al., 2020). Кожний повтор складається з еволюційно консервативної ділянки, яка кодує 5S рРНК, та варіабельного міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS). Висока еволюційна консервативність кодувальної ділянки 5S рДНК є необхідною для збереження функцій 5S рРНК у складі великої субодиниці рибосоми (Barciszewska et al., 2001).

Транскрипцію 5S рДНК забезпечує РНК-полімераза III та транскрипційні фактори (TF). Особливістю відповідні РНКполімерази III є будова її промотора, який складається з внутрішніх та зовнішніх елементів. Внутрішні елементи промотора – А-бокс, ІЕ (internal element) та С-бокс – є частиною кодувальної ділянки (Douet, Tourmente, 2007; Layat et al., 2012). Ці елементи промотора  $\epsilon$ мішенню для приєднання ТГ. Зокрема, до специфічного для 5S рДНК С-боксу послідовно приєднуються ТГІІІА і ТГІІІС. Після цього з 5S рДНК зв'язується TFIIIB (Paule, White, 2000), який забезпечує плавлення подвійної спіралі ДНК перед кодувальною ділянкою, а також взаємодію комплексу ініціації транскрипції з РНК-полімеразою (Kassavetis et al., 2001; Vaillant, 2006). Отже, мутації у внутрішніх елементах промотора мають не тільки впливати на структуру 5S рРНК та будову рибосоми, але й позначатись на експресії 5S рДНК.

На відміну від кодувальної ділянки, IGS є еволюційно мінливим, оскільки більша його частина не транскрибується та, імовірно, не має будь-яких функцій. Більше того, існує точка зору, що для ініціації транскрипції 5S рДНК зовнішні елементи промотору взагалі непотрібні (Geiduschek, Tocchini-Valentini, 1988; Orioli et al., 2012). Відповідно, виникнення мутацій у IGS не повинно мати негативних наслідків. Тим не менш, у IGS рослин виявлені відносно консервативні елементи, які беруть участь у ініціації (зовнішні елементи промотора) та термінації (термінатор) транскрипції (Venkateswarlu et al., 1991; Fulneček et al., 2002; Cloix et al., 2003; Douet, Tourmente, 2007; de Souza et al., 2020). Найбільш детально значення зовнішніх елементів промотора для транскрипції 5S рДНК досліджено для арабідопсису (Cloix et al., 2003), тоді як для інших видів рослин це питання все ще потребує подальшого вивчення.

Транскрипційна активність 5S рДНК регулюється також із залученням епігенетичних механізмів. Так, для арабідопсису було показано, що РНК-спрямоване ДНК метилування (RdDM) по несиметричним сайтам СНН викликає репресію транскрипції

частини копій 5S рДНК, обумовлюючи явище дозової компенсації (Douet et al., 2009; Layat et al., 2012). Метилування цитозину по симетричним сайтам, як і модифікації гістонів (деацетилування), також беруть участь у епігенетичному контролі активності 5S рДНК (Vaillant, Paszkowski, 2007; Layat et al., 2012).

Для 5S рДНК характерна узгоджена (концертна) еволюція, яка гомогенізації повторюваних послідовностей, полягає V ШО призводить до зменшення внутрішньогеномної і, як наслідок, міжвидової та внутрішньопопуляційної гетерогенності (Cloix et al., 2003). Оскільки мутації, що виникають в IGS, мають переважно характер, вони демонструють тенденцію до нейтральний то накопичення. цьому IGS еволюціонує Завдяки більшою 3 швидкістю, ніж інші ділянки геному, що призводить до появи відмінностей у послідовності IGS тісно споріднених видів або в деяких випадках окремих популяцій. Саме тому, IGS широко використовується в якості молекулярного маркера для ідентифікації видів та у філогенетичних дослідженнях.

#### 58 рДНК як філогенетичний маркер у насінних рослин

Молекулярна організація 5S рДНК була досліджена у кількох представників Голонасінних: Abies alba, Larix decidua, L. kaempferi, Picea glauca та Pseudotsuga menziesii. Встановлено, що у цих видів 5S рДНК розташовані на повтори або ОДНОМУ декількох хромосомних сайтах, а розмір повторюваної одиниці варіює у широких межах - від 220 до 880 нп (Liu, 2003; Besendorfer et al., 2005). У Pinus radiata (родина Pinaceae) 5S рДНК представлена приблизно 3000 копій повторів, які належать до двох класів розміром 525 і 850 пн (Gorman et al., 1992). У різних групах Голонасінних виявлено два типи організації 5S рДНК: L-тип, коли повтори 5S рДНК утворюють окремі тандемно організовані локуси, та S-тип, коли ділянки 5S рДНК локалізовані в міжгенному спейсері 45S рДНК (Garcia, Kovařík, 2013). Наразі не з'ясовано, який саме тип організації 5S рДНК був предковим, оскільки для Ginkgoales

характерний S-тип організації, а для Cycadales – L-тип, хоча ці дві групи рослин вважають одними з найдавніших серед насінних Kovařík, 2013; Galian, рослин (Garcia, 2012). Цікаво. шо Гнетоподібні (Gnetophytes) відрізняються від інших голонасінних поліморфізмом рДНК. При 5S найбільшим порівнянні близькоспоріднених родів Гнетоподібних знайдено різницю в організації 5S рДНК, числі копій на геном та кількості хромосомних локусів, причому залежність між кількістю копій та розмірами геному відсутня (Wang et al., 2019).

Однією з перших покритонасінних рослин, для якої було детально охарактеризована структура та організація 5S рДНК, є модельний об'єкт генетичних досліджень Arabidopsis thaliana з Капустяні (Brassicaceae), яка належить родини ЛО клади Суперрозиди (Superrosids). Для чотирьох екотипів A. thaliana була показана наявність близько 1000 копій 5S рДНК у гаполоїдному геномі. Це становить приблизно 0,7% від загального розміру геному. Також встановлено існування двох структурних класів, які відрізняються за довжиною (Campell et al., 1992; Cloix et al., 2000). У іншого представника родини Brassicaceae, Brassica campestris знайдено лише один клас IGS 5S рДНК довжиною 376 нп, а розмір кодувальної ділянки становить 119 нп (Bhatia et al., 1993).

аналізу 5S рДНК 3a допомогою досліджували також філогенетичні представників відносини родини Миртові (Myrtaceae). Аналіз 25 видів родини показав, що у цій родині 5S рДНК представлена двома основними класами, а розмір повтору лежить у межах від 308 до 413 нп. Показано, що камедевмісні рослини роду Eucalyptus (підроди Blakella та Corymbia) є більш спорідненими до роду Angophora, ніж до інших Евкаліптових, що не місять камедь (Udovicic et al., 1995).

При вивчені молекулярної організації 5S рДНК льону *Linum usitatissimum* (родина Linaceae) було показано, що у представників цього виду існує як мінімум 5 груп 5S рДНК, які мають довжину повторювальної ділянки 350 нп, але відрізняються між собою за

послідовностями (Schneeberger et al., 1989). Пізніше для характеристики 5S рДНК цього роду було застосовано метод FISHгібридизації. У більшості випадків 5S рДНК розташовується на кількох парах хромосом. Для видів, які мають 30 пар хромосом, сайти 5S рДНК знаходяться на трьох парах: 3, 8 та 13. У видів із 16 хромосомами знайдено лише 1 сайт на хромосомній парі 3, а у видів з 18 хромосомами – лише на парі 1. Отримані результати дозволяють висунути припущення, що види з 2n = 16, 18 та 30 походять від спільного предка з 2n = 16 (Muravenko et al., 2004; Muravenko et al., 2009).

У представників роду *Populus* (родина Salicaceae) було охарактеризовано два класи 5S рДНК: клас 1 (розмір повтору – 634 нп), який містить мікросателітні повтори GAA у IGS, і клас 2 (543 нп), який не містить таких повторів. IGS класу 1 демонструє поліморфізм за мікросателітними послідовностями: два клони містять по 10 повторюваних одиниць GAA, а один клон – 16 таких одиниць (Negi et al., 2002).

Порівняльний аналіз 5S рДНК виявився інформативним і при вивченні представників родини Бобові (Fabaceae). Дослідження десяти видів роду Vigna підроду Ceratotropis показали, що наявність чотирьох типів 5S рДНК, довжина повтору у яких варіює від 214 до 342 нп. У IGS V. radiata знайдено делецію розміром 100 нп. Види роду Vigna відрізняються швидкістю еволюції та характером мінливості 5S рДНК. Зокрема, для восьми досліджених видів (V. trilobata, V. mungo та ін.) притаманна низька внутрішньовидова дивергенція цієї ділянки геному, тоді як у V. nakashimae та V. riukiuensis присутні різноманітні внутрішньогеомні варіанти, що імовірно свідчить про неповну гомогенізацію повторів 5S рДНК. Крім того, за допомогою цього молекулярного маркера було зроблено крок до розуміння походження тетраплоїдного виду V. glabrescens. Раніше вважалося, що цей вид походить або від диплоїдних видів секції Angulares, V. angularis та V. umbellata, або від тетраплоїдного виду *V. reflexo-pilosa*, який в свою чергу

походить від *V. hirtella* та *V. trinervia* (секції Angulares). Проте з використанням 5S рДНК показано, що предкові види *V. glabrescens* ймовірно не належать до секції Angulares, а один з предкових видів належить до секції Ceratotropis. Другий предковий вид можливо втратився (Saini, Jawali, 2009).

Аналіз послідовностей IGS 5S рДНК показав єдине походження шести різновидів культурного арахісу. Дикий вид *Arachis monticola* (родина Fabaceae) розглядається як безпосередній тетраплоїдний предок, від якого в ході одомашнення виник культурний *А. hypogaea*. В ході дослідження з'ясовано, що є два типи послідовностей 5S рДНК (довжиною приблизно 470 нп), що належать до A або B геному арахісу (Grabiele et al., 2012).

У геномі винограду *Vitis vinifera* (родина Vitaceae) було знайдено три варіанти 5S рДНК. Два варіанти – основний довгий (609 нп) та короткий (549 нп) – знайдено у всіх досліджених генотипах. Ці два варіанти різняться між собою не тільки за довжиною, а й нуклеотидними замінами в ділянці IGS. Третій варіант – DEL short repeat (489 нп) – знайдений лише в одному генотипі. Він є найкоротшим та відрізняється від другого (короткого) варіанту делецією в 60 нуклеотидних пар. Показано також, що всі три варіанти локалізовані в одному локусі (Falistocco et al., 2007).

5S рДНК була досліджена й для кількох представників клади Суперастериди (Superasterids). Прикладом використання 5S рДНК як молекулярного маркеру у філогенетиці є дослідження родини Пасльонових (Solanaceae). Було встановлено, що у понад 60 видів роду *Nicotiana* довжина повторів 5S рДНК складає від 220 до 1055 нп. Наявність одного класу повторів характерно для 37 видів роду, а для 29 видів особливістю є наявність двох класів повторів 5S рДНК. Саме диплоїдні види роду *Nicotiana* (n=12) переважно характеризуються одним класом 5S рДНК, тоді як тетраплоїдні (n=24) – переважно двома класами, успадкованими від обох диплоїдних предків. Для культурного виду *Nicotiana tabacum*  знайдено два структурні класи 5S рДНК, довжиною приблизно 646 та 430 нп, що відрізняються між собою довжиною міжгенного спейсера. У IGS вісімнадцяти видів роду *Nicotiana* знайдена GC-багата ділянка, яка відсутня як у двох видів цього роду (*N sylvestris*, *N. longiflora*), так і у представників споріднених родів *Solanum* та *Petunia* (Комарницький, Комарницький, 2000; Matyasek et al., 2002).

Нуклеотидні послідовності 5S рДНК чотирьох ліній картоплі Solanum tuberosum, 26 диких видів роду Solanum (сек. Petota), томату Solanum lycopersicon (= Lycopersicon esculentum) було порівняно між собою та з 5S рДНК дикого європейського виду S. dulcamara (сект. Dulcamara). Встановлено, що довжина повтору коливається від 285 до 349 нп. Центральна частина IGS є високо мінливою завдяки чисельним делеціям/дуплікаціям короткого мотиву, який демонструє схожість з кодувальною ділянкою. Структурні перебудови, знайдені в IGS, були використані для філогенетичних зв'язків досліджуваних реконструкції вилів. Зокрема встановлено, що томат є близько спорідненим з видами Solanum, які належать до сек. Petota (Volkov et al., 2001).

При вивченні 5S рДНК представників родини Айстрові (Asteraceae) встановлено, що приблизно у 25% представників родини 5S та 45S рДНК мають однакову локалізацію на хромосомах. Це пояснюється тим, що послідовності цих двох рДНК об'єднані у комбіновані повтори, які містять кодувальні ділянки для всіх чотирьох рРНК. Аналіз послідовності 26–18S IGS *Artemisia absinthium* показав, що в цьому спейсері присутні дві ділянки 5S рДНК: одна, більш консервативна знаходиться ближче до кінця гену 26S (5SrDNA-1), а друга, менш консервативна – ближче до центру IGS (5SrDNA-2). На відміну від 5SrDNA-1, яка виявляє усі структурні ознаки функціонального гена, 5SrDNA-2 містить делецію у внутрішньому промоторі і, швидше за все, є псевдогеном. Інсерція 5S рДНК у спейсер 45S рДНК, імовірно, відбулась до відділення роду *Artemisia* від інших представників Asteraceae

(Garcia, 2009; Garcia et al., 2010; Mazzella et al., 2010). Можливо, у цьому процесі були залучені ретротранспозони (Kalendar et al., 2008) або така перебудова відбулася за рахунок негомологічної рекомбінації 5S та 45S рДНК, що знаходилися на одній хромосомі (Garcia, 2009). Ще одним можливим механізмом є позахромосомна рекомбінація кільцевої копії 5S рДНК та хромосомного локусу 45S рДНК (Drouin, de Sá, 1995; Cohen et al., 2008; Garcia, 2009). Також можливим видається об'єднання цих двох ділянок ще у кільцевій формі до їх інтегрування у хромосому (Garcia, 2009).

покритонасінних Серед рослин 5SрДНК добре охарактеризована для багатьох економічно важливих культур. Наприклад, була 5S рДНК використана для з'ясування внутрішньовидової таксономії чаю, Camellia sinensis (L.) O. Kunzte (родина Theaceae) з метою розрізнити сорти, які мають різне походження та стійкість до холоду. Зазначається, що в геномі Camellia sinensis присутні два класи 5S рДНК, що відрізняються за довжиною: 300 та 325 нп, відповідно. Отримані результати вказують, що 5S рДНК можуть бути використані для диференціації сорту Chinary від інших сортів, таких як Assamica i Cambod (Singh, Singh, 2001; Singh, Ahuja, 2006).

Більшість культивованих видів роду Лобода (Chenopodium, родина Amaranthaceae) – це поліплоїди, але їхні таксономія та еволюція все ще погано вивчені. Порівняння послідовностей ITS ядерної 45S рДНК, чотирьох ділянок пластидного геному та IGS 5S рДНК двох тетраплоїдних (2n=4x=36) видів, андського С. quinoa та північноамериканського С. berlandieri та їх диплоїдних (17)родичів видів) дозволили прояснити ïΧ походження. Філогенетичний аналіз підтвердив алотетраплоїдне походження обох видів із залученням диплоїдів, які належать до двох різних геномних груп (геноми А і В). Імовірно, донором субгеному В для С. quinoa та С. berlandieri був вид, подібний до нині існуючого С. ficifolium. Походження субгеному А є більш дискусійним якого питанням, вирішення використовувалися кілька ДЛЯ

молекулярних маркерів, оскільки для обох тетраплоїдних видів локусу рДНК материнського одного показана втрата ВИДУ. Родоначальник А-субгеному С. quinoa міг бути подібним до існуючого виду С. nevadense. З іншого боку, А-субгеном С. berlandieri має спільні повторювані послідовності з С. watsonii, але не з *С. nevadense* (Kolano et al., 2016). Результати порівняльного аналізу послідовностей ITS ядерної 45S рДНК, чотирьох ділянок пластидного геному та IGS 5S рДНК і геномної іп situ гібридизації (GISH) для п'яти євразійських гексаплоїдних (2n=6x=54) видів, С. album, С. giganteum, С. pedunculare, С. formosanum та С. opulifolium, а також їх диплоїдних та тетраплоїдних родичів, вказують на їх алоплоїдне походження. Імовірним донором В-геному для цих алогексаплоїдів міг бути один з досліджених раніше диплоїдних видів. Водночас, донором геному А для *С. album, С. giganteum* та C. pedunculare міг бути материнський вид, схожий на C. betaceum (C. strictum auct.), або на C. striatiforme, або на азіатські диплоїди (Kolano et al., 2019).

За допомогою 5S рДНК вдалося пролити світло на філогенію та таксономію поширеного у всьому світі роду Апетопе (родина Ranunculaceae). Виявилось, що для представників цього роду високий рівень поліморфізму послідовності характерні IGS 5S рДНК, наявність кількох варіантів повторів різної довжини (від 150 до 400 нп) та псевдогенів. 5S рДНК в роді Anemone еволюціонувала в два етапи: (1) виникнення та дивергенція двох класів 5S рДНК, з довгим (підрід Anemone) та з коротким (підрід Anemonidium) IGS; (2) подальше збільшення або зменшення розміру IGS. Філогенетичний аналіз свідчить на користь гіпотези, що A. parviflora може бути батьківським видом та донором субгеному алополіплоїдів, *A. multifida* (BBDD) D для та A. baldensis (AABBDD). В A. baldensis в ході еволюції можливо відбувся внутрішньолокусний обмін ділянками, з подальшою заміною 5S рДНК. Таким чином, певні ділянки субгеному D замінилися на відповідні ділянки субгеному В. Також представлено докази (слабка

гомогенізація, наявність псевдогенів і нових варіантів 5S рДНК) щодо двох моделей еволюції 5S рДНК у геномі представників підродів *Anemone* та *Anemonidium*: концертної еволюції та «народження і смерті» (Mlinarec et al., 2016).

Серед однодольних рослин 5S рДНК найбільш добре вивчена у основних злакових культур, які належать до родини Poaceae, особливо у представників триби Triticeae.

Однією з перших культур, для якої 5S рДНК була використана як молекулярний маркер, є м'яка пшениця *Triticum aestivum* L. та споріднені види родів Aegilops/Triticum та Lophopyrum. При цьому було виявлено два варіанти повторів, які мають однакові по довжині кодувальні послідовності, але різні IGS довжиною 290 та 380 нп, різних хромосомах. розташовані на Аналіз особливостей молекулярної еволюції цих двох варіантів 5S рДНК показав, що гомогенізація повторів відбувається лише в межах локусу. На сьогоднішній день відомо кілька типів геномів пшениці: A, B, D та G. Iмовірно, А геном у T. turgidum та T. aestivum походить від геному *Т. urartu*, а не від *Т. топососсит*, як вважалося. Раніше, базуючись на морфологічних, географічних та цитогенетичних даних було висунуто гіпотезу, що донорами геному В для поліплоїдних пшениць T. turgidum та T. aestivum є види Aegilops bicornis, Ae. longissima, Ae. searsii, Ae. sharonensis, Ae. speltoides та *Т. urartu*. Аналіз 5S рДНК підтвердив, що донором геному В цих видів є диплоїдний вид A. speltoides (Kerby, Kuspira, 1987; Dvorak et al., 1988; Dvorak et al., 1989; Dvorak et al., 1993, Baum et al., 2004). Донором геному G для T. zhukovskyi та T. timopheevii також вважається A. speltoides, але інша форма цього виду, відмінна від донора геному В (Dvořák, Zhang, 1990). Відповідно, донором геному D T. aestivum був вид A. tauschii (McFadden, Sears, 1944).

На відміну від диплоїдних видів родів *Aegilops/Triticum*, для яких характерні два класи 5S рДНК (410 нп та 500 нп), алоплоїдні види мають менше структурних класів, ніж їхні предкові види разом. Загалом у геномах близько споріднених родів *Aegilops* та

*Triticum* знайдено кілька гаплотипів 5S рДНК, які різняться за розміром (Baum, Feldman, 2010a; Baum et al., 2012).

Представник роду *Amblyopyrum (А. muticum,* родина Poaceae) характеризується такими ж класами 5S рДНК, що і диплоїдні види *Aegilops.* Це дає підстави для включення *Amblyopyrum* до роду *Aegilops* (Baum et al., 2009). На основі аналізу 5S рДНК були також висунуті припущення щодо походження деяких видів роду *Aegilops.* Так, тетраплоїдний вид *Ae. crassa* є імовірно предковим для трьох гексаплоїдних видів – *Ae. glumiaristata, Ae. juvenalis* та *Ae. Vavilovii,* а тетраплоїдний *Ae. neglecta* – для гексаплоїдного виду *Ae. recta* (Baum et al., 2012).

Багато видів, що є представниками родів *Lophopyrum* (Löve 1980), *Thinopyrum* (Löve 1980) та *Trichopyrum* (Löve 1986) є близькими родичами пшениці, які можуть бути використані як донори ознак для її покращення. Проте, різні автори відносили їх у один, два або більше родів. Щоб уточнити це питання, було проаналізовано послідовності 5S рДНК 15 видів з цих родів. Було виділено 5 структурних класів 5S рДНК: довгий S1, довгий E1, короткий E1, короткий S1 та довгий P1. Порівняння послідовностей дає підстави вважати, що всі досліджувані види можна об'єднати в один рід під назвою *Lophopyrum* або *Thinopyrum* (Baum, Johnson, 2018).

На основі цитогенетичних та морфологічних досліджень було виділено новий рід родини Злакових – Douglasdeweya, яки включає в себе два види: D. deweyi та D. wangii (Yen et al., 2005). Близькоспорідненими родами до нього є роди Pseudoroegneria та Agropyron (триба Triticeae). Аналіз 5S рДНК показав, що види Douglasdeweya з геномом PPStSt мають два структурних класи 5S рДНК – довгий P1 (482, 484, 508 нп) та короткий S1 (447-448 нп). Pseudoroegneria (геном StSt або StStStSt) характеризується довгим S1(483 нп) варіантом та коротким S1 (447-449 нп) варіантом. На противагу цьому, Agropyron (геном PP) має тільки один структурний клас – довгий P1 (483 нп). Ймовірно, предкові види родів Pseudoroegneria та Agropyron є донорами різних типів геномів

алоплоїдних видів роду *Douglasdeweya* (Baum, Johnson, 2008a; Baum et al., 2008b).

Рід *Dasypyrum* (родина Poaceae) включає в себе два види: однорічний широко розповсюджений вид *D. villosum* (2n=2x=14) та багаторічний рідкісний вид *D. breviaristatum* (2n=2x=14 та 2n=4x=28). Цей рід є цікавим для дослідження, оскільки його представники можуть слугувати хорошим генетичним матеріалом для покращення таких культур як пшениця та рис. Походження та структура геному *D. breviaristatum* протягом років є темою для дискусій. Відомо, що геном диплоїду *D. villosum* (VV) відрізняється від диплоїдного цитотипу *D. breviaristatum* (VbVb), але немає єдиної думки щодо конституції тетраплоїдного цитотипу: не зрозуміло, чи це авто-, чи алотетраплоїд. Пролити світло на це питання вдалося завдяки аналізу послідовностей 5S рДНК. Виявилось, що цитотип *D. breviaristatum*, який містить 4 набори хромосом, є алотетраплоїдом (VVVbVb) (Baum et al., 2014).

Рід *Elymus* є одним з найбільших у трибі Triticeae. Він складається приблизно з 150 видів, які широко розповсюджені в помірних та субтропічних регіонах. Кілька видів роду (*E. dahuricus*, excelsus, E. tangutorum, E. cylindricus, E. breviaristatus Ta  $E_{\cdot}$ *E. nutans*) було раніше запропоновано віднести до окремого роду Campeiostachys. Тож, щоб прояснити філогенетичні відносини цих двох родів, було проаналізовано 247 нуклеотидних послідовностей 5S рДНК. Було ідентифіковано кілька структурних класів: довгий довгий Y1. Результати H1, **S**1 та короткий порівняння послідовностей підтверджують, що досліджувані види роду *Elymus*, StYH dahuricus. містять гаплом (Elymus *E. excelsus.* ШО E. tangutorum, E. cylindricus, E. breviaristatus та E. nutans), дійсно мають бути віднесенні до окремого роду Campeiostachys (Yang et al., 2019).

У видів роду *Hordeum* (родина Poaceae) було знайдено кілька структурних класів 5S рДНК довжиною від 313 до 544 нп: загалом десять, але автори вказують, що цю кількість можна скоротити до

семи. За результатами порівняння цих класів була отримана дендрограма, яка відображає філогенетичні відносини між диплоїдними, тетраплодними та гексаплоїдними видами цього роду (Baum, Johnson, 1994; Baum et al., 2010b).

Вивчення представників триби Aveneae (родина Poaceae) (Avena, V п'яти родах *Helictotrichon*, ЩО показало, Pseudarrhenatherum, Lagurus, Trisetum) довжина повтору 5S рДНК варіює від 285 до 329 пн, крім Helictotrichon aetolicum, у якого НП. ділянки складає 456 довжина шiєї Варіації у решти досліджуваних видів (Avena sativa, Avena macrostachya, 26 видів Helictotrichon, Pseudarrhenatherum longifolium, Lagurus ovatus та Trisetum spicatum) значною мірою зумовлені вставками або делеціями в IGS, як було визначено з аналізу послідовностей 163 клонів. Ділянка, що кодує 5S рРНК у досліджуваних видів Aveneae є консервативною за довжиною (119-120 нп) та послідовністю. Проте, у двох видів, Helictotrichon bromoides та Helictotrichon marginatum, додатково знайдено повтори, які містять кодувальну ділянку більшого розміру, яка утворилась за рахунок дуплікація двох сегментів розміром 24 та 21 нп. Проте, автори припускають, що послідовності з дуплікаціями не обов'язково є псевдогенами, оскільки мутації не зачіпають внутрішніх елементів промотора. При філогенетичному аналізі послідовностей 5S рДНК було зроблено висновок, що великий рід *Helictotrichon* є парафілетичним. Більше того, *H. desertorum*, що за морфологічними ознаками відносять до цього роду, виявився досить віддаленим видом. А. macrostachya та jahandiezii отриманій дослідниками Н. на філодендрограмі займають ізольоване положення. Цей результат добре узгоджується із тим, що ці два види є ендеміками північної Африки та зустрічаються лише в кількох локаціях (Röser et al., 2001).

Поліморфізм та успадкування 5S рДНК детально вивчали для видів роду *Avena* (родина Poaceae). На загал було ідентифіковано шість структурних класів, які отримали назви відповідно до гапломів/геномів, які їх містять: довгі класи A1, B1, M1 та короткі

класи С1, D1, M1. Довгий та короткий М1 класи були виявлені у багаторічного виду *А. macrostachya*, який вважається найбільш видом роду. Цікаво, предковим шо довгий M1 клас близькоспоріднений до короткого С1, в той час як короткий М1 – до довгих A1 та B1 класів. Короткий клас D1 є найбільш віддаленим від решти. Двадцять два види містили довгий А1 клас. Послідовності довгого В1 класу були знайдені у тетраплоїдів A. abyssinica, A. vaviloviana та диплоїдів A. atlanica, A. longiglumis. Для 4 диплоїдів, 2 тетраплоїдів та 5 гексаплоїдів характерний короткий C1 клас. Відповідно, короткий D1 клас знайдено у всіх гексаплоїдів (5 видів) та у двох клонах А. clauda. Дослідники нагадують, що, згідно попереднім уявленням, геном В вважався характерним лише для тетраплоїдних видів, а геном D – лише для гексаплоїдних. Проте, детальне дослідження гаплотипів 5S рДНК спростувало цю думку. Також висунуто гіпотезу, що диплоїдні види Avena можуть бути донорами не тільки геному А, але й геному D для всіх гексаплоїдних видів вівса. На загал, за результатами аналізу 5S рДНК представників роду було запропоновано схему ймовірного походження тетраплоїдних та гексапоїдних видів, зображену на рисунку (Peng et al., 2008).

При дослідженні підтриби Dactylidinae (Poeae), що включає в себе лише два роди – *Dactylis* і *Lamarckia*, а саме – у *Dactylis glomerata*, було знайдено найкоротший варіант 5S рДНК серед представників родини Poaceae довжина якого становить 258 нп. При порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК *D. glomerata* та інших видів виявили подібність з віддаленими представниками Aveninae, що може свідчити про можливу міжвидову гібридизацію (Volkov, Panchuk, 2014).

Філогенетичні дослідження представників роду Setaria (підродина Panicodae, родина Poaceae) – S. adhaerans, S. verticillata, S. faberii, S. viridis (3 форми), S. italica (2 форми), які базувалися на аналізі послідовностей 5S рДНК, показали, що досліджувані види можна розділити на чотири групи. Довжина повтору 5S рДНК

варіювала від 300 до 450 нп. Була підтверджена спорідненість *S. italica* та *S. viridis* з однакових географічних локацій.



**Рис.** Можливий сценарій походження та еволюції тетраплоїдних та гексаплоїдних видів вівсу, запропонований на основі даних про присутність у геномі різних структурних класів 5S рДНК. Неперервні лінії показують передачу довгого A1 та коротких C1 або D1 гаплотипів. Пунктирні лінії позначають інші гіпотетичні шляхи передачі геномів (Peng et al., 2008)

Отримані результати підтверджують попередні гіпотези про різницю між геномами A та B та культурні центри походження *S. italica* (Китай, Європа та територія від Афганістану до Лівану). Крім того, прояснилося питання щодо таксономічного положення *S. verticillata*, який є алотетраплоїдним видом і містить в собі геноми A та B. Ймовірно донором геному A є *S. italica*, а геному B – S. adhaerans (Benabdelmouna et al., 2001a; Benabdelmouna et al., 2001b). Пізніше детальніше дослідження IGS 5S рДНК S. italica з 35 різних місцевостей Європи та Азії дозволило виділити три типи послідовностей 5S рДНК; тип I в свою чергу був розділений на сім підтипів. Підтипи Іа та Іb широко поширені в Азії та Європі. Підтип Іс поширений в Китаї, Кореї та Японії. Підтип Іd відрізняється делецією розміром 20 нп та має унікальну С-послідовність. Він характерний для Афганістану та північно-західного Пакистану і сильно відрізнявся від інших підтипів типу I, що свідчить на користь гіпотези про незалежне одомашнення форм, які його несуть. Підтип Ід поширений у Пакистані. Тип II також є високо поліморфним та включає в себе чотири підтипи ІІа-ІІd. На противагу цьому, тип III є досить мономорфним і, можливо, його варто розглядати як підтип типу ІІ. Також варто зазначити, що підтип Па найбільше відрізняється від всіх типів (Fukunaga et al., 2006).

Рід Oryza (підродина Oryzoideae, родина Poaceae) налічує 21 дикий вид та два культурних види – *O. sativa* та *O. glaberrima*. В межах роду розрізнять 10 типів геному. Філогенетичні відносини між дев'ятьма видами роду Oryza та спорідненість шести різних досліджувалися використанням гібридизації геномів 3 та 5S рДНК. ділянки Довжина сиквенування отриманих послідовностей становила від 194 до 490 нп. Було показано основні відмінності між А геномом та В, С, D геномами, які були раніше виділені на основі морфологічних та цитогенетичних досліджень. 5S рДНК O. australiensis (геном Е) групується з В, С, D геномами в одну кладу, в той час як послідовності O. brachyantha (геном F) суттєво відрізнялися та групувалися окремо від інших видів (McIntyre et al., 1992).

Пізніше аналіз молекулярної та хромосомної організації 5S рДНК диплоїдних та тетраплоїдних диких видів рису показав, що (1) в геномі досліджених видів одночасно присутні декілька різних класів 5S рДНК; (2) деякі класи 5S рДНК є спільними для різних видів; (3) у цих спільних класів спостерігається міжвидова дивергенція. У тетраплоїдних видів виявлено втрату сайтів 5S рДНК одного з предкових диплоїдів. На загал, довжина повтору 5S рДНК у досліджених видів рису варіювала від 322 до 587 нп. Було виділено п'ять різних структурних класів 5S рДНК для представників роду. Результати порівняння IGS 5S рДНК дозволили уточнити філогенетичні відносини для 14 диких та 1 культурного виду (*O. sativa*) (Zhu et al., 2008).

# висновки

Завдяки своїй універсальній будові та присутності у геномах всіх еукаріотичних організмів, 5S рДНК є універсальною моделлю для послідовностей еволюції повторюваних вивчення V різних таксономічних групах. Довжина повторюваної одиниці 5S рДНК змінюється у широких межах – від 214 до 1055. При цьому довжина кодувальної ділянки становить 119-120 нп у всіх досліджених видів, тоді як розміри IGS є мінливими. В одному геномі можуть бути присутні один або декілька структурних класів 5S рДНК. Присутність декількох класів, правило, наслідком ЯК € поліплоїдізації.

Еволюційні зміни IGS пов'язані із накопичення нуклеотидних вставками / делеціями ампліфікацією субповторів. замін, та Особливістю молекулярної еволюції 5S рДНК є поява в геномі пошкоджених копій цих генів – псевдогенів, які мають структурні зміни не тільки у IGS, але й в кодувальній ділянці (Volkov et al., 2001; Tynkevich, Volkov, 2014; Volkov et al., 2017). Швидкий темп призводить накопичення мутацій ДО того, ЩО різницю V послідовностях IGS можна виявити між спорідненими видами і навіть між різними популяціями одного виду. Завдяки цьому, 5S рДНК є інформативним молекулярним маркером для оцінки генетичної мінливості та реконструкції філогенії таксонів низького рангу (рід-вид-популяція). Особливо ефективним є використання 5S рДНК для уточнення походження поліплоїдних видів.

На сьогодні молекулярна організація та еволюція 5S рДНК досліджені у кількох групах голо- та покритонасінних рослин. Проте, аналіз наявної літератури свідчить, що 5S рДНК все ще недооціненою використовується залишається та недостатньо такими молекулярними маркерами, порівняно з ЯК ділянки пластидного геному, або ITS 45S рДНК. Подальші дослідження більш повно розкрити потенціал цієї дозволять ділянки як інструменту молекулярної філогенетики.

# СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 1. Комарницький СІ, Комарницький ІК. (2000) Організація та еволюція генів 5S рРНК у роді *Nicotiana. Биоп клет.* **16**(3): 205-211.
- Barciszewska MZ, Szymañski M, Erdmann VA, Barciszewski J. (2001) Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim Polon*. 48(1): 191-198.
- 3. Baum BR, Bailey LG, Belyayev A, Raskina O, Nevo E. (2004) The utility of the nontranscribed spacer of 5S rDNA units grouped into unit classes assigned to haplomes a test on cultivated wheat and wheat progenitors. *Genome.* **47**(3): 590-599.
- 4. Baum BR, Edwards T, Johnson A. (2010b) Codependence of repetitive sequence classes in genomes: phylogenetic analysis of 5S rDNA families in *Hordeum* (Triticeae: Poaceae). *Genome*. **53**(3): 180-202.
- 5. Baum BR, Edwards T, Johnson DA. (2009) Phylogenetic relationships among diploid *Aegilops* species inferred from 5S rDNA units. *Mol Phylogenet Evol.* **53**(1): 34-44.
- 6. Baum BR, Edwards T, Johnson DA. (2014) What does the nr5S DNA multigene family tell us about the genomic relationship between *Dasypyrum breviaristatum* and *D. villosum* (Triticeae: Poaceae)? *Mol Genet Genomics*. **289**(4): 553-565.
- 7. Baum BR, Edwards T, Johnson DA. (2008b) Loss of 5S rDNA units in the evolution of *Agropyron*, *Pseudoroegneria*, and *Douglasdeweya*. *Genome*. **51**(8): 589-598.

- Baum BR, Edwards T, Mamuti M, Johnson DA. (2012) Phylogenetic relationships among the polyploid and diploid *Aegilops* species inferred from the nuclear 5S rDNA sequences (Poaceae: Triticeae). *Genome.* 55(3): 177-193.
- Baum BR, Feldman M. (2010a) Elimination of 5S DNA unit classes in newly formed allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum*. *Genome*. 53(6): 430-438.
- 10. Baum BR, Bailey LG. (2004) The origin of the A genome donor of wheats (Triticum: Poaceae) – a perspective based on the sequence variation of the 5S DNA gene units. *Genet Resour Crop Evol.* 51: 183–196.
- 11.Baum BR, Johnson DA. (2018) Lophopyrum Á. Löve (1980), Thinopyrum Á. Löve (1980), Trichopyrum Á. Löve (1986): one, two or three genera? A study based on the nuclear 5S DNA. Genet Resour Crop Evol. 65: 161-186.
- 12.Baum BR, Johnson DA. (2008a) Molecular confirmation of the genomic constitution of *Douglasdeweya* (Triticeae: Poaceae): demonstration of the utility of the 5S rDNA sequence as a tool for haplome identification. *Mol Genet Genomics.* 279(6): 621-628.
- 13. Baum BR, Johnson DA. (1994) The molecular diversity of the 5S rRNA gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*. **37**(6): 992-998.
- 14. Benabdelmouna A, Abirached-Darmency M, Darmency H. (2001a) Phylogenetic and genomic relationships in *Setaria italica* and its close relatives based on the molecular diversity and chromosomal organization of 5S and 18S-5.8S-25S rDNA genes. *Theor Appl Genet.* 103(5): 668-677.
- 15.Benabdelmouna A, Shi Y, Abirached-Darmency M, Darmency H. (2001b) Genomic in situ hybridization (GISH) discriminates between the A and the B genomes in diploid and tetraploid *Setaria* species. *Genome*. **44**(4): 685-690.
- 16.Besendorfer V, Krajačić-Sokol I, Jelenić S, Puizina J, Mlinarec J, Sviben T, Papeš D. (2005) Two classes of 5S rDNA unit arrays of the silver fir, *Abies alba* Mill.: structure, localization and evolution. *Theor Appl Genet.* **110**(4): 730-741.

- 17.Bhatia S, Singh K, Jagannathan V, Lakshmikumaran M. (1993) Organization and sequence analysis of the 5S rRNA genes in *Brassica campestris*. *Plant Sci.* **92**(1): 47-55.
- 18. Campell BR, Song Y, Posch TE, Cullis CA, Town CD. (1992) Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. **112**(2): 225-228.
- 19. Cloix C, Tutois S, Mathieu O, Cuvillier C, Espagno MC, Picard C, Tourmente S. (2000) Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genom Res.* **10**(5): 679-690.
- 20. Cloix C, Yukawa Y, Tutois S, Sugiura M, Tourmente S. (2003) *In vitro* analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant J.* 35(2): 251-261.
- 21.Cohen S, Houben A, Segal D. (2008) Extrachromosomal circular DNA derived from tandemly repeated genomic sequences in plants. *Plant J.* **53**(6): 1027-1034.
- 22.de Souza TB, Gaeta ML, Martins C, Vanzela ALL. (2020) IGS sequences in *Cestrum* present AT-and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol Biol Reports.* **47**: 55-66.
- 23. Douet J, Tourmente S. (2007) Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*. **99**: 5-13.
- 24. Douet J, Tutois S, Tourmente S. (2009) A Pol V–Mediated Silencing, Independent of RNA–Directed DNA Methylation, Applies to 5S rDNA. *PLoS Genet.* **5**(10): e1000690.
- 25.Drouin G, de Sá MM. (1995) The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol.* **12**(3): 481-493.
- 26. Dvořák J, di Terlizzi P, Zhang HB, Resta P. (1993) The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*. **36**(1): 21-31.

- 27. Dvořák J, McGuire PE, Cassidy B. (1988) Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome.* **30**(5): 680-689.
- 28. Dvořák J, Zhang HB, Kota RS, Lassner M. (1989) Organization and evolution of the 5S ribosomal RNA gene family in wheat and related species. *Genome.* **32**: 1003-1016.
- 29. Dvořák J, Zhang HB. (1990) Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc Natl Acad Sci.* **87**(24): 9640-9644.
- 30. Falistocco E, Passeri V, Marconi G. (2007) Investigations of 5S rDNA of *Vitis vinifera* L.: sequence analysis and physical mapping. *Genome*. **50**(10): 927-938.
- 31. Fukunaga K, Ichitani K, Kawase M. (2006) Phylogenetic analysis of the rDNA intergenic spacer subrepeats and its implication for the domestication history of foxtail millet, *Setaria italica. Theor Appl Genet.* **113**: 261-269.
- 32. Fulneček J, Lim K, Leitch A, Kovařík A, Matyášek R. (2002) Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity*. **88**: 19-25.
- 33. Galian JA. (2012) Early evolutionary colocalization of the nuclear ribosomal 5S and 45S gene families in seed plants: evidence from the living fossil gymnosperm *Ginkgo biloba*. *Heredity*. **108**(6): 640-646.
- 34.Garcia S. (2009) Linkage of 45S and 5S rRNA genes in Artemisia (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. *Chromosoma*. 118(1): 85-97.
- 35.Garcia S, Kovařík A. (2013) Dancing together and separate again: gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 45S rRNA gene (rDNA) organisation. *Heredity.* **111**: 23-33.
- 36. Garcia S, Panero JL, Siroky J, Kovarik A. (2010) Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 45S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *BMC Plant Biol.* **10**: 176.

- 37.Garcia S, Wendel JF, Borowska-Zuchowska N, Aïnouche M, Kuderova A, Kovarik A. (2020) The utility of graph clustering of 5S ribosomal DNA homoeologs in plant allopolyploids, homoploid hybrids, and cryptic introgressants. *Front Plant Sci.* 11: 41.
- 38.Geiduschek EP, Tocchini-Valentini GP. (1988) Transcription by RNA polymerase III. Annual review of biochemistry. 57(1): 873-914.
- 39.Gorman SW, Teasdale R, Cullis C. (1992) Structure and organization of the 5S rRNA genes (5S DNA) in *Pinus radiata* (Pinaceae). *Plant Syst Evol.* **183**: 223-234.
- 40. Grabiele M, Chalup L, Robledo G, Seijo G. (2012) Genetic and geographic origin of domesticated peanut as evidenced by 5S rDNA and chloroplast DNA sequences. *Plant Syst Evol.* **298**(6): 1151-1165.
- 41.Kalendar R, Tanskanen J, Chang W, Antonius K, Sela H, Peleg O, Schulman AH. (2008) Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(15): 5833-5838.
- 42.Kassavetis GA, Letts GA, Geiduschek EP. (2001) The RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIIB participates in two steps of promoter opening. *The EMBO journal.* **20**(11): 2823-2834.
- 43.Kerby K, Kuspira J. (1987) The phylogeny of the polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). *Genome*. **29**(5): 722-737.
- 44.Kolano B, McCann J, Orzechowska M, Siwinska D, Temsch E, Weiss-Schneeweiss H. (2016) Molecular and cytogenetic evidence for an allotetraploid origin of *Chenopodium quinoa* and *C. berlandieri* (Amaranthaceae). *Mol Phylogenet Evol.* **100**: 109-123.
- 45.Kolano BM, Cann J, Oskędra M, Chrapek M, Rojek M, Nobis A, Weiss-Schneeweiss H. (2019) Parental origin and genome evolution of several eurasian hexaploid species of *Chenopodium* (Chenopodiaceae). *Phytotaxa*. **392**(3): 163-185.

- 46.Kubis S, Schmidt T, Heslop-Harrison JS. (1998) Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Ann Bot.* **82**(1): 45-55.
- 47.Kubis SE, Heslop-Harrison JS, Desel C, Schmidt T. (1998) The genomic organization of non-LTR retrotransposons (LINEs) from three *Beta* species and five other angiosperms. *Plant Mol Biol.* **36**: 821-831.
- 48.Layat E, Sáez-Vásquez J, Tourmente S. (2012) Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. **53**(2): 267-276.
- 49.Lee SI, Kim NS. (2014) Transposable elements and genome size variations in plants. *Genomics informatics*. **12**(3): 87-97.
- 50.Liu Z. (2003) Intragenomic and interspecific 5S rDNA sequence variation in five Asian Pines. *Am J Bot.* **90**(1): 17-24.
- 51. Matyasek R, Fulnecek J, Lim KY, Leitch AR, Kovarík A. (2002) Evolution of 5S rDNA unit arrays in the plant genus *Nicotiana* (Solanaceae). *Genome*. **45**(3): P. 556-562.
- 52. Mazzella C, Rodríguez M, Vaio M, Gaiero P, López-Carro B, Santiñaque FF, Folle GA, Guerra M. (2010) Karyological features of *Achyrocline* (Asteraceae, Gnaphalieae): stable karyotypes, low DNA content variation and linkage of rRNA genes. *Cytogenet Genome Res.* **128**(1-3): 169-176.
- 53. McFadden ES, Sears ER. (1944) The artificial synthesis of *Triticum* spelta. Rec Soc Genet Am. 13: 26-27.
- 54. McIntyre CL, Winberg B, Houchins K, Appels R, Baum BR. (1992) Relationships between *Oryza* species (Poaceae) based on 5S DNA sequences. *Plant Syst Evol.* **183**: 249-264.
- 55. Mlinarec J, Franjević D, Bočkor L, Besendorfer V. (2016) Diverse evolutionary pathways shaped 5S rDNA of species of tribe Anemoneae (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Bot J Linn Soc.* **182**(1): 80-99.
- 56. Muravenko OV, Amosova AV, Samatadze TE, Semenova O, Nosova IV, Popov KV, Shostak NG, Zoshchuk SA, Zelenin AV.

(2004) Chromosomal localization of 5S and 45S ribosomal DNA in species of *Linum* L. section Linum (syn= Protolinum and Adenolinum). *Genetika*. **40**(2): 256-260.

- 57. Muravenko OV, Yurkevich OY, Bolsheva NL, Samatadze TE, Nosova IV, Zelenina DA, Volkov AA, Popov KV, Zelenin AV. (2009) Comparison of genomes of eight species of sections Linum and Adenolinum from the genus *Linum* based on chromosome banding, molecular markers and RAPD analysis. *Genetica*. **135**(2): 245-255.
- 58.Negi MS, Rajagopal J, Chauhan N, Cronn R, Lakshmikumaran M. (2002) Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides*. *Genome*. **45**(6): 1181-1188.
- 59. Orioli A, Pascali C, Pagano A, Teichmann M, Dieci G. (2012) RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene.* **493**(2), 185-194.
- 60.Paule MR, White RJ. (2000) Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* **28**(6): 1283-1298.
- 61.Peng YY, Wei YM, Baum BR, Zheng YL. (2008) Molecular diversity of the 5S rRNA gene and genomic relationships in the genus *Avena* (Poaceae: Aveneae). *Genome*. **51**(2): 137-154.
- 62.Röser M, Winterfeld G, Grebenstein B, Hemleben V. (2001) Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae., *Mol Phylogenet Evol.* 21(2): 198-217.
- 63. Saini A, Jawali N. (2009) Molecular evolution of 5S rDNA region in Vigna subgenus Ceratotropis and its phylogenetic implications, Plant Syst Evol. 280(3-4): 187-206.
- 64. Schneeberger RG, Creisse GP, Cullis CA. (1989) Chromosomal and molecular analysis of 5S RNA gene organization in the flax, *Linum usitatissimum*. *Gene*. **83**(1): 75-84.
- 65. Singh D, Ahuja PS. (2006) 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification. *Genome*. 49(1): 91-96.

- 66. Singh D, Singh M. (2001) Organization of 5S ribosomal RNA genes in tea (*Camellia sinensis*). *Genome*. **44**(1): 143-146.
- 67. Tynkevich Y.O., Volkov R.A. Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. Cytol. Genet. 2014, 48:1-6.
- 68.Udovicic F, McFadden GI, Ladiges PY. (1995) Phylogeny of Eucalyptus and Angophora based on 5S rDNA spacer sequence data. Mol Phylogenet Evol. 4(3): 247-256.
- 69. Vaillant I. (2006) Etude des régulations génétiques et épigénétiques de l'expression des gènes d'ARNr 5S chez *Arabidopsis thaliana*. Génétique humaine. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. Français (Doctoral dissertation).
- 70. Vaillant I, Paszkowski J. (2007) Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Current opinion in plant biology*. 10(5): 528-533.
- 71. Venkateswarlu K, Lee SW, Nazar RN. (1991) Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene.* 105(2): 249-253.
- 72. Volkov AR, Panchuk II. (2014) 5S rDNA of Dactylis glomerata (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Bull Vavilov Soc Genet Breed Ukraine*. **12**(1): 3-11.
- 73. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV, Hosiawa-Baranska M, Maluszynska J, Hemleben V. (2017) Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*, *BMC Plant Biol.* 17(1): 1-15.
- 74. Volkov RA, Zanke C, Panchuk II, Hemleben V. (2001) Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. Petota): application for molecular phylogeny and breeding. *Theor Appl Genet.* 103(8): 1273-1282.
- 75. Wang W, Wan T, Becher H, Kuderova A, Leitch IJ, Garcia S, Leitch AR, Kovařík A. (2019) Remarkable variation of ribosomal DNA organization and copy number in gnetophytes, a distinct lineage of gymnosperms. *Ann Bot.* **123**(5): 767-781.

- 76. Yang CR, Baum BR, Johnson DA, Zhang HQ, Zhou YH. (2019) Molecular diversity of the 5S nuclear ribosomal DNA in *Campeiostachys* with StHY haplome constitution. *J Syst Evol.* 58(1): 69-76.
- 77. Yen C, Yang JL, Baum BR. (2005) *Douglasdeweya*: a new genus, with new species and a new combination (Triticeae: Poaceae). *Can J Bot.* 83:413-419.
- 78.Zhu XY, Cai DT, Ding Y. (2008) Molecular and cytological characterization of 5S rDNA in *Oryza* species: genomic organization and phylogenetic implications. *Genome*. **51**(5): 332-340.

# ЗАСТОСУВАННЯ 5S рДНК ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ КУЛЬТУРНИХ ФОРМ *СУDONIA OBLONGA* MILL.

#### Ю.О. Тинкевич, Т.О. Деревенко, Р.А. Волков

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

E-mail: y.tynkevich@chnu.edu.ua

Завдяки швидким темпам еволюції IGS (intergenic spacer, IGS) 5S рДНК є зручним молекулярним інструментом для ідентифікації близькоспоріднених форм рослин. Для перевірки можливості 5S сортоспецифічного використання рДНК ЯК видо-ЧИ представників молекулярного маркера ДЛЯ триби Maleae ампліфіковано 5S рДНК диких форм чотирьох видів цієї триби (Cydonia oblonga, Malus sylvestris, Mespilus germanica, Pyrus communis) та п'яти культурних форм айви. Також розшифровано нуклеотидну послідовність IGS для чотирьох індивідуальних рДНК *C. oblonga*. Встановлено, повторів 5S ЩО довжина повторюваної ділянки 5S рДНК у представників триби Maleae знаходиться в межах від 280 до 410 пн. Аналіз послідовностей 5S рДНК *С. oblonga* виявив два класи повторів зі значною різницею у послідовності IGS. Принаймні два різні за довжиною варіанта повторів знайдені в геномах всіх досліджених видів. Для кожного виду отримані специфічні набори ампліфікатів 5S рДНК. Показана можливість ідентифікувати за набором ПЛР-продуктів гібридну універсальну підщепу УУПРОЗ-6, для якої спостерігається кодомінантне успадкування варіантів повторів 5S рДНК від обох батьківських видів: С. oblonga та M. domectica.

# ВСТУП

Рід *Cydonia* Mill. (айва) належить до триби Maleae (яблуневі) родини Rosaceae. Як і в інших представників цієї триби, основне хромосомне число в айви становить 17 (Campbell et al., 2007; Dickinson et al., 2007; Xiang et al., 2017; Sun et al., 2018; Liu et al., в інших групах родини Rosaceae основні 2020), натомість хромосомні числа значно менші. Раніше походження хромосомного набору представників триби Maleae пояснювали тим, що спільний предок цієї триби виник унаслідок гібрідизації між представниками підродин Spiraeoideae (x=9) та Amygdaloideae (x=8) з подальшою алополіплоїдизацією (Phipps et al., 1991; Evans et al., 2002; Talent et al., 2005; Campbell et al., 2007). Однак, сиквенування геному домашньої яблуні Malus domestica дало змогу встановити, що він виник унаслідок подвоєння хромосомного набору, який стався у гіпотетичного предкового виду з основним хромосомним числом x=9. Ця дуплікація геному мала місце приблизно 50 млн років тому і супроводжувалася втратою однієї хромосомної пари, що й призвело до появи у видів триби Maleae гаплоїдного хромосомного набору, який містить 17 хромосом (Velasco et al., 2010).

Єдиний представник роду *Cydonia – C. oblonga* Mill. – походить із територій Кавказу, Середньої та Малої Азії, Північного Ірану і культивується з давніх часів (Verbylaitė et al., 2006; Alipour et al., 2014). Ареал вирощування айви нині поширився на все Середземномор'я, Центральну Європу, Північну та Південну Америки. Айва культивується як плодове дерево, а також як підщепа груші у штамбовій культурі і вважається оптимальною підщепою завдяки стійкості до низьких температур (Зуєнко та ін., 2009; Tatari et al., 2020). Один зі способів отримання нових сортів айви з поліпшеними властивостями – гібридизація між різними сортами та з іншими видами з триби Maleae (Бученков и др., 2013; Sahin et al., 2020).

Нині селекція, спрямована на отримання культурних рослин із заданими властивостями, стає значно ефективнішою та швидкою використанню молекулярних маркерів. Зокрема, завдяки молекулярні маркери можуть використовуватися для відтворення шляхів та з'ясування часу походження існуючих культурних рослин, гібридних форм і філогенетичних зв'язків між ними. Ще один важливий напрямок молекулярної селекції – паспортизація тобто перевірка автентичності сортового сортів, насіння та саджанців із використанням молекулярних маркерів (Сиволап та ін., 2001; Глазко та ін., 2006; Gross et al., 2018; Ivanovych et al., 2018).

Існує багато підходів до створення молекулярних маркерів на базі різних послідовностей геномної, мітохондріальної та пластидної ДНК. Одним із найбільш зручних та ефективних джерел універсальних молекулярних маркерів є ділянки геному, які кодують рРНК разом зі спейсерними послідовностями, котрі їх розділяють (так звана рДНК) (Liu et al., 2003; Volkov et al., 2017; Simeone et al., 2018). Така популярність рибосомних генів пояснюється особливостями їхньої структури. Рибосомні ДНК організовані у геномі в кластери складені з тандемних повторів, кожен з яких містить консервативні кодувальні послідовності та мінливі спейсерні ділянки. Кількість повторів у кластері може досягати кількох сотень і навіть тисяч. Для 35S рДНК характерне явище концертної еволюції (гомогенізації) одночасної узгодженої зміни всіх повторюваних ділянок у геномі (Elder et al., 1995; Lunerova et al., 2017). Проте у алополіплоїдних видів 5S рДНК, на відміну від 35S, часто не зазнає гомогенізації, зберігаючи особливості будови, характерні для батьківських форм, що особливо цінно для ідентифікації гібридних форм та з'ясування їх походження (Волков та ін., 2003; Lim et al., 2005; Volkov et al., 2007; Volkov et al., 2017). Враховуючи цей аспект, наша мета – визначення можливості використання 5S рДНК як молекулярного маркера для ідентифікації та паспортизації сортів і гібридних форм айви C. oblonga Mill. і споріднених культур триби Maleae, а також дослідження особливостей організації й еволюції цих ділянок геному.

# МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом дослідження були культурні форми айви – тип А, IC 2-10, IC 4-6, IC 4-12 та підщепа гібридного походження УУПРОЗ-6 (Українська універсальна підщепа розоцвітих, гібрид між айвою та яблунею – Зуєнко та ін., 2009) з колекції Української науково-дослідної станції карантину рослин Інституту захисту рослин НААН України (с. Бояни Чернівецької обл.). Також досліджені види триби Maleae – *Cydonia oblonga* Mill., *Malus sylvestris* Hort. (яблуня лісова), *Mespilus germanica* L. (мушмула) та *Ругиs соттипіs* L. (груша звичайна) з колекції Ботанічного саду Чернівецького національного університету ім. Юрія Федьковича.

Екстракцію загальної ДНК зі свіжого рослинного матеріалу та зразків проводили з використанням цетавлону як гербарних лізуючого агента (Панчук та ін., 2007). Якість препаратів ДНК перевіряли електрофоретично в 1 %-му агарозному гелі. Ампліфікація повторюваних одиниць 5S рДНК проводилася методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в PTS-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) в 25 мкл реакційної суміші, яка містила такі компоненти: 0,1 мкг загальної геномної ДНК, 1,0 од. акт. ДНКполімерази (HotStartTaq DNA polymerase, QIAGEN, США), 0,1мМ суміші дезоксирибонуклеотидфосфатів, 1× буфер для ПЛР та 0.5 мкМ кожного з праймерів: 5S-14a-Not (5' - CAA TGC GGC CGC GAG AGT AGT ACT AGG ATG CGT GAC - 3') i 5S-15-Not (5' - CAT TGC GGC CGC TTA ACT TCG GAG TTC TGA TGG GA - 3'), які мають послідовність, комплементарну до консервативної кодувальної ділянки 5S рДНК і додатковий сайт упізнавання ендонуклеази рестрикції Not I, необхідний для подальшого клонування (виділено жирним шрифтом).

Ампліфікацію 5S рДНК здійснювали за програмою: (I) активація ферменту та денатурація ДНК – 95 °С, 15 хв; (II) денатурація ДНК – 94 °С, 45 с; (III) посадка праймера – 57 °С, 1 хв; (IV) синтез ДНК – 72 °С, 1 хв; (V) завершення ампліфікації – 72 °С, 8 хв; (VI) зупинка реакції – 4 °С. ПЛР здійснювалася протягом 35 циклів. Електрофорез ПЛР-продуктів проводили в 2 %-му агарозному гелі при напруженості 2,5 V/см і температурі 4 °С. Для визначення довжини отриманих фрагментів їх електрофоретичну рухливість порівнювали з рухливістю ДНК-маркера Gene Ruler DNA Leader Mix (Thermo Fisher Scientific, USA).

Для клонування ПЛР-продукти обробляли ендонуклеазою рестрикції Not I та лігували по компліментарних липких кінцях у сайт упізнавання Eco52 I плазмідного вектора pLitmus 38 із використанням T4 ДНК-лігази (Thermo Fisher Scientific, USA). Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL1-blue здійснювали методом електропорації з використанням приладу *E. coli* Pulser (BioRad, CША). Клони з рекомбінантними плазмідами виявляли методом *blue-white colony selection* та перевіряли рестриктазним картуванням. Плазміди виділяли методом лужного лізису (Sambrook et al., 1989). Ферментативні реакції проводили згідно з рекомендаціями фірми-постачальника.

Рекомбінантні плазміди, які містили вставки 5S рДНК, сиквенували з використанням Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit на сиквенаторі ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems, CША). Первинну обробку отриманої нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR (DNASTAR, 1998). Пошук послідовностей гомологічних до IGS (intergenic spacer, IGS) айви здійснювали у базі даних GenBank за допомогою програми BLAST (Altschul et al., 1997).

# РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для проведення досліджень нами використано такі рослинні зразки: чотири сорти айви-підщепи – Тип А (Анжерская), IC 2-10, IC 4-6, IC 4-12 та універсальна підщепа гібридного походження УУПРОЗ-6, а також дика форма айви *C. oblonga* та три інші види триби Maleae – *Malus sylvestris*, *Mespilus germanica* та *P. communis*.
З листя досліджуваних рослин виділяли геномну ДНК та проводили ампліфікацію послідовностей 5S рДНК за допомогою ПЛР. Електрофоретичний аналіз ампліфікатів показав (рис. 1), що розміри повторюваних ділянок 5S рДНК у досліджених форм айви та в інших представників триби Maleae перебувають в межах 280– 410 нп (табл. 1).



**Рис. 1.** Результати електрофоретичного розділення ПЛР-продуктів 5S рДНК різних видів триби Maleae. Треки: 1, 9 – маркер, 2 – *Pyrus communis*, 3 – *Malus sylvestris*, 4 – *Mespilus germanica*, 5 – *Cydonia oblonga* (дика форма), 6 – Тип А, 7 – IC 4-12, 8 – УУПРОЗ-6, 10 – IC 2-10, 11 – IC 4-6, 12 – IC 4-12

Для всіх зразків встановлена наявність у геномі кількох варіантів повторів 5S рДНК різної довжини. Зокрема, для всіх досліджених форм айви характерна одночасна наявність двох варіантів повторів – довгого (410 нп) і середнього (360 нп) – із різницею у розмірах близько 50 нп. При цьому порівняння інтенсивності смуг ДНК на електрофореграмі показує, що у культурних форм айви повтори більшої довжини представлені в геномі більшим числом копій. Проте у дикої форми *C. oblonga* вміст різних за довжиною 5S рДНК повторів виявився приблизно однаковим.

В інших досліджених нами представників триби Maleae немає довгого варіанта повторювальної ділянки 5S рДНК, знайденого у

С. oblonga. Натомість, повтори із розмірами, близькими до середнього (360 нп) варіанта айви наявні в геномах Malus sylvestris і *P. communis*. Крім того, Malus sylvestris також має короткий варіант повторювальної послідовності 5S рДНК, довжина якого становить 320 нп (табл. 1), що збігається за розмірами з одним із варіантів повтору 5S рДНК форми УУПРОЗ-6. Отже, універсальна підщепа УУПРОЗ-6 має три варіанти повторів 5S рДНК, які за довжиною відповідають повторам айви (410 та 360 нп) та яблуні (360 та 320 нп). Такий результат підтверджує гібридне походження УУПРОЗ-6 і свідчить, що набір ампліфікатів 5S рДНК можна використовувати для молекулярної ідентифікації цієї форми.

Зразок	Розмір ПЛР- продуктів, нп
Тип А	410, 360
IC 2-10	410, 360
IC 4-6	410, 360
IC 4-12	410, 360
УУПРОЗ-6	410, 360, 320
<i>Cydonia oblonga</i> , дика форма	410, 360
Malus sylvestris	360, 320
Pyrus communis	380-300
Mespilus germanica	320, 280

**Таблиця 1.** Поліморфізм за довжиною продуктів ПЛР 5S рДНК *Cydonia oblonga* та інших представників триби Maleae

У *Р. соттипі*я виявлено кілька варіантів послідовності 5S рДНК, які дещо відрізняються за довжиною і утворюють на електрофореграмі неперервну зону в межах від 300 до 380 нп. В геномі *Mespilus germanica* також спостерігається два типи 5S рДНК повторів із різницею за довжиною близько 30 нп. Один із варіантів повтору збігається за довжиною із коротким варіантом у геномі *Malus sylvestris* (320 нп); інший має довжину 280 нп.

Як показано під час попередніх досліджень, наявність кількох варіантів 5S рДНК спостерігається і у представників інших груп родини Rosaceae (Тинкевич та ін., 2014), а також інших груп квіткових рослин (Ishchenko et al., 2018).

Відомо, що для послідовностей, які кодують 5S рибосомні РНК, характерний високий рівень еволюційного консерватизму. Розміри цих послідовностей сталі в межах таксономічних груп високого рангу і для всіх вищих рослин становлять від 118 до 120 нп (Douet et al., 2007). З огляду на це можна стверджувати, що довжина IGS у всіх досліджених форм *C. oblonga* складає приблизно 290 нп для довгого та 240 нп для середнього варіантів повторів, відповідно. Для інших видів триби Maleae довжина IGS коливається в межах від 160 до 300 нп. Тобто, розміри повторів 5S рДНК досліджених зразків переважно перебувають у діапазоні, характерному для вищих рослин (Simeone et al., 2018; de Souza et al., 2019) та для родини Rosaceae, зокрема (Lim et al., 2005; Tynkevich et al., 2014). Проте в геномі *Mespilus germanica* нами також знайдений незвично короткий варіант із довжиною IGS близько 160 нп, який раніше не спостерігали в інших представників родини Rosaceae.

На наступному етапі дослідження для сорту айви Тип А здійснено клонування повторювальної послідовності 5S рДНК. Чотири рекомбінантні плазміди сиквеновано та проаналізовано. В усіх просиквенованих клонах у межах вставки виявлено фрагменти кодувальних ділянок включно з послідовностями використаних для Між праймерів. фрагментами кодувальної ПЛР ділянки послідовності IGS, ідентифіковано довжини яких V ДВОХ розшифрованих клонах становлять 245-248 нп, а у інших двох -297-298 нп (табл. 2), що цілком відповідає очікуваним довжинам IGS для двох варіантів повторів 5S рДНК айви.

Царра инони		IGS
пазва клону	Довжина, нп	Вміст GC-пар, %
CyobA1	248	27
CyobA2	245	27
CyobA3	298	31
CyobA4	297	31

Таблиця 2. Характеристика IGS 5S рДНК клонів Cydonia oblonga

Аналіз нуклеотидного складу сиквенованих послідовностей IGS показав низький вміст GC-пар, який дещо відрізняється у двох варіантів повторів (табл. 2).

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS просиквенованих клонів *C. oblonga* та їх порівняння із доступною у базі даних Genbank послідовністю IGS представника триби Maleae, груші японскої – *P. pyrifolia* (Burm.) Nak. (номер у базі даних – AB621370.1) виявило наявність великої кількості нуклеотидних замін та інделів (інсерцій/делецій) – як між послідовностями цих двох видів, так і між індивідуальними клонами айви (рис. 2). Виявлені мутації розподілені відносно рівномірно за довжиною спейсера, крім порівняно консервативних ділянок на початку та в кінці IGS.

Згідно з літературними даними, у *Arabidopsis thaliana* (L.) Неупh. на початку та в кінці IGS розміщуються зовнішні сигнали регуляції транскрипції (Douet et al., 2007). Наявність гомологічних консервативних ділянок в IGS показана також для ряду інших груп квіткових рослин (Tynkevich et al., 2014; Ischenko et al., 2018; Tynkevich et al., 2019). Зокрема, до таких сигналів відносять полі-Т послідовність на 5' кінці IGS, що виконує функцію термінатора транскрипції. Крім того, на 3' кінці IGS розміщені три короткі мотиви – послідовності ТАТАТА, GC та C, які в арабідопсису знаходяться у позиціях, відповідно -28, -12 та -1 від початку кодувальної ділянки та, ймовірно, відіграють важливу роль у регуляції ініціації транскрипції (Douet et al., 2007; Simon et al., 2018; de Souza et al., 2019).

Порівняльний аналіз послідовностей 5S рДНК показав наявність подібних мотивів на початку та наприкінці IGS *C. oblonga* та *P. pyrifolia* (рис. 2). Так, оліго-dT послідовність у цих видів починається з шостого нуклеотиду IGS та має довжину 34 нп. При цьому в усіх досліджених клонів у ній є точкові заміни порівняно з консенсусною послідовністю. Зовнішні промоторні елементи, як за нуклеотидною послідовністю, так і за розташуванням ідентичні з арабідопсисом, крім GC-мотиву, в якому наявна однонуклеотидна заміна.

	10	20	30	40	50	60
Consensus		+ TTTTCTTTTTT	+ TATTTATTTT	+ <b>TTTTTT</b> GXTAA	+ XXCATTTTTAX	+ XXXXT
CyoblA1	A	.A.GG	.CC.A.	СТС	AAA.AAAAA.A	AAGA.
CyoblA2	G	A.C	.TT	.GTC	AAGGAAAAG	GAC
Cyob1A3		C	A	A	TT	GTAC.
CyoblA4	C	C	A	A	ттс	GTAC.
P.pyriioiia	I			•••••		
	70	80	90	100	110	120
Consensus	TTGGGXGXXGCAA-	GGXACGC	GTCGTATATA	AXCGAGTCTC	GTGXTTGGGXG	XTGAA
CyoblA1	.CA.AT.AG	A	A.AAA.A.	A.A.AC.	AATT	
CyoblA2	A.ATAGG	AA	A.AAA.C.	A.A.AC.	AATT	·
Cyob1A3		CGTC		.G	AA.	A
CyoblA4		CGTC		.G	AA.	A
P.pyrifolia		G	· · · · C · · · · ·		G.	G
	130	140	150	160	170	180
	+	+	+	+	+	+
Consensus	XXXXXTAAXATACA	AAGAAAXAXAX	ATAXTXXXXX	TG-AXGAAXT	ATTATTTTXTA	AXTTTA
CyoblA1	CTTTTA		CG.CGTCT	·T	AGA.	•••
Cyob1A2		G	A TAATA	.A1	GA.	···
CvoblA4	TCAAAG	G.A.		T.CC.		T.
P.pyrifolia		A.G.(	G	G.G.	A	cc.
	190	200	210	220	230	240
Consensus	-CXXGXXATCXX-T	TGAAXAT'	ͲͲͲͲϾϷϷͲͲͲ	CGTGATXTXC	GCATGAAXGCA	XAA-A
CyoblA1	GT.CGAT	G	'	TAT.T.	A	c
Cyob1A2	GT.CGAT	.AG	'	TAT.T.	A	c
Cyob1A3	A.AA.AAGGG.	T.ATA.		CC.A.	T	TG.
CyoblA4	A.AA.AAGGG.	T.ATA.		CC.A.	· · · · · · · · · T · · ·	TG.
P.pyriiolia		••		••••	CAC	
	250	260	270	280	290	9 <u>_ 780</u>
Consensus	GXTTAXGGXXTCAT	GAGCAAAGAA	ATGGTTATAT		GTCATAGACTA	AC
CyoblA1	.GTGA	AG				
CyoblA2	.GAT.AGA	AG			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Cyob1A3	.ACAG		• • • • • • • • • •	d	G	•
CyoblA4	.ACAG	•••••		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	••••G••••••	•
r.pyriiolia					CC	
			"TATA"	-DOX	GC	6

**Рис. 2.** Вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК клонів *Cydonia oblonga* та *Pyrus pyrifolia*. Сірим виділено потенційні зовнішні елементи промотора

На основі вирівнювання був вирахуваний відсоток подібності між послідовностями IGS (табл. 3). Виявилося, що між двома клонами довгого варіанта повтору айви цей показник становить 81,6%, а між двома клонами середнього – 99,7%. Водночас подібність між IGS довгих і середніх варіантів повторів 5S рДНК знаходиться у межах від 46,7 до 48,2 %, тобто значно нижча. Отже, у геномі С. oblonga наявні два структурні класи повторюваних одиниць 5S рДНК, які значно відрізняються за нуклеотидною Проте послідовністю IGS. V просиквенованих фрагментах кодувальних ділянок обох класів нуклеотидних замін не виявлено. Також відсутня різниця між послідовностями різних класів у структурі зовнішніх промоторних елементів. Ці особливості можуть свідчити про функціональність генів обох класів повторів 5S рДНК айви.

Cydonia oblonga та Pyrus pyrifolia									
Вид / клон	CyobA1	CyobA2	CyobA3	CyobA4	P. pyrifolia				
CyobA1	100	81,6	48,2	47,8	40,2				
CyobA2		100	47,1	46,7	45,1				

100

99,7

100

56,0

55,4

100

CyobA3

CyobA4

P. pyrifolia

Таблиця 3. Рівень подібності (%) IGS 5S рДНК

Також встановлено, що в айви подібність середнього варіанта IGS (клони CyobA3 та CyobA4) до IGS P. pyrifolia вища (55,4-56,0 % табл. 3), ніж їх подібність до довгого варіанта IGS (клони CyobA1 та СуовА2). Тож, можна припустити, що два варіанти повторів 5S рДНК виникли у геномі спільного предку родів Cydonia та Pyrus ще до їхньої дивергенції. Можливо, поява двох класів повторів 5S рДНК – це наслідок дуплікації геному в еволюції триби Maleae. В такому разі, присутність двох дивергованих варіантів повторів 5S рДНК можна очікувати і у представників

гіпотеза інших родів, цієї триби. Така які належать ДО про внутрішньогеномний узгоджується **i**3 нашими даними поліморфізм 5S рДНК в усіх вивчених нами видів триби Maleae. Альтернативним поясненням наявності кількох варіантів 5S рДНК у айви може бути гібридне походження цього виду, внаслідок якого в одному геномі поєдналися різні батьківські форми повторів, як це було продемонстровано нами для універсальної підщепи УУПРОЗ-6. Для остаточного прояснення питання про причини поліморфізму 5S рДНК представників триби Maleae повторів V необхідні додаткові дослідження.

# ВИСНОВКИ

Отже, для геномів представників триби Maleae характерний поліморфізм повторів 5S рДНК значний 3a довжиною та послідовністю нуклеотидів. Імовірними причинами прого поліморфізму можуть бути дуплікація геному на ранній стадії еволюції триби Maleae та/або міжвидова гібридизація на пізніших етапах. Поліморфізм повторів 5S рДНК може бути використаний для ідентифікації гібридних форм при міжвидовій гібридизації, а також у молекулярній таксономії та при вивченні еволюції геному представників триби Maleae.

# СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 1. Бученков ИЭ, Чернецкая АГ. (2013) Получение и анализ признаков отдаленных гибридов *Cydonia oblonga* × *Malus domestica*. *Аграрная Россия*. **9**: 2-4.
- 2. Волков РА, Панчук II, Борисюк ЛТ, Борисюк МВ. (2003) рДНК рослин: організація, еволюція, застосування. *Цитологія і генетика*, **37**: 72-78.
- 3. Глазко ВІ, Лісневич ЛО, Радченко ОМ. (2006) Принципи і застосування молекулярно-генетичних маркерів пшениці. Физиология и биохимия культ. растений. **38**(1): 3-18.

- 4. Зуєнко ВМ, Матвієнко МВ. (2009) Агробіологічні особливості універсальної підщепи УУПРОЗ-6. *Садівництво*. **62**: 123-126.
- 5. Панчук II, Волков РА. (2007) Практикум з молекулярної генетики. *Чернівці: Рута*.
- 6. Сиволап ЮМ, Требельський ДЮ. (2001) Идентификация генотипов кукурузы при помощи РСК-анализа. Цитологія і генетика, **35**(3): 14-21.
- 7. Тинкевич ЮО, Волков РА. (2014) Новий структурний клас 5S рДНК *Rosa wichurana* Crep. *Доповіді НАН України*. (5): 143-148.
- Alipour M, Abdollahi H, Abdossi V, Ghasemi A, Adli M, Mohammadi M. (2014) Evaluation of vegetative and reproductive characteristics and distinctness of some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes from different regions of Iran. *Seed Plant Improv. J.* **30**(3): 507-529.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- Campbell CS, Evans RC, Morgan DR, Dickinson TA, Arsenault MP. (2007) Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the Maloideae, Rosaceae): Limited resolution of a complex evolutionary history. *Plant Syst. Evol.* 266: 119-145.
- 11.De Souza TB, Gaeta ML, Martins C, Vanzela ALL. (2019) IGS sequences in *Cestrum* present AT-and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol. Biol. Rep.* 47(1): 55-66.
- 12. Dickinson TA, Lo E, Talent N. (2007) Polyploidy, reproductive biology, and Rosaceae: understanding evolution and making classifications. *Plant Syst. Evol.* **266**: 59-78.
- 13.DNASTAR. (1998) MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.

- 14. Douet J, Tourmente S. (2007) Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*. **99**: 5-13.
- 15. Elder Jr JF, Turner BJ. (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q. Rev. Biol.* **70**(3): 297-320.
- 16. Evans RC, Campbell CS. (2002) The origin of the apple subfamily (Maloideae, Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. Am. J. Bot. 89(9): 1478-1484.
- 17.Gross BL, Wedger MJ, Martinez M, Volk GM, Hale C. (2018) Identification of unknown apple (*Malus × domestica*) cultivars demonstrates the impact of local breeding program on cultivar diversity. *Genet. Resour. Crop Evol.* 65(5): 1317-1327.
- 18. Ishchenko OO, Panchuk II, Andreev IO, Kunakh VA, Volkov RA.
  (2018) Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschapmpsia antarctica*. *Cytol. Genet.* **52**(6): 416–421.
- 19. Ivanovych Y, Volkov R. (2018) Genetic relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars from Ukraine determined by microsatellite markers. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **93**(1): 64-72.
- 20.Lim KY, Werlemark G, Matyasek R, Bringloe JB, Sieber V, El Mokadem H, Meynet J, Hemming J, Leitch A R, Roberts AV. (2005) Evolutionary implication of permanent odd polyploidy in the stable sexual, pentaploid of *Rosa canina* L. *Heredity* (*Edinb.*). **94**(5): 501-506.
- 21. Liu BB, Campbell CS, Hong DY, Wen J. (2020) Phylogenetic relationships and chloroplast capture in the *Amelanchier-Malacomeles-Peraphyllum* clade (Maleae, Rosaceae): evidence from chloroplast genome and nuclear ribosomal DNA data using genome skimming. *Mol. Phylogenet. Evol.* 147: 106784.
- 22.Liu ZL, Zhang D, Wang XQ, Ma XF, Wang XR. (2003) Intragenomic and intraspecific 5S rDNA sequence variation in five Asian pines. *Am. J. Bot.* **90**(1): 17-24.

- 23. Lunerova J, Renny-Byfield S, Matyášek R, Leitch A, Kovařík A. (2017) Concerted evolution rapidly eliminates sequence variation in rDNA coding regions but not in intergenic spacers in *Nicotiana tabacum* allotetraploid. *Plant Syst. Evol.* **303**(8): 1043-1060.
- 24. Phipps JB, Robertson KR, Rohrer JR, Smith PG. (1991) Origins and evolution of subfam. Maloideae (Rosaceae). *Syst. Bot.* **16**(2): 303-332.
- 25. Sahin M, Mısırlı A, Gökkür S, Aksoy D, Özaktan H. (2020) application of hybridization breeding technique for fire blight resistance on *Cydonia oblonga*: a base study on susceptibility, heterosis, and heterobeltiosis parameters. *Internat. J. Fruit Sci.* **20**(3): 1458-1469.
- 26. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. (1989) Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 27. Simeone MC, Cardoni S, Piredda R, Imperatori F, Avishai M, Grimm GW, Denk T. (2018) Comparative systematics and phylogeography of *Quercus* section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation. *Peer. J.* **6**: e5793.
- 28. Simon L, Rabanal FA, Dubos T et al. (2018) Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **46**(6): 3019-3033.
- 29. Sun J, Shi S, Li J, Yu J, Wang L, Yang X, Guo L, Zhou S. (2018) Phylogeny of Maleae (Rosaceae) based on multiple chloroplast regions: implications to genera circumscription. *BioMed Res. Int.* (ID 7627191): 1-10.
- 30. Talent N, Dickinson TA. (2005) Polyploidy in *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Maloideae): evolutionary inferences from flow cytometry of nuclear DNA amounts. *Botany* 83(10): 1268-1304.
- 31. Tatari M, Mahlouji M, Ghorbani E. (2020) Determination of the appropriate harvest time and storability of some cultivars and promising genotypes of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) in cold storage conditions. *J. Hort. Sci.* **33**(4): 639-653.

- 32. Tynkevich YO, Volkov RA. (2014) Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* **48**(1): 1-6.
- 33. Tynkevich YO, Volkov RA. (2019) 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol. Genet.* **53**(6): 459-466.
- 34. Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J. et al. (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus×domestica* Borkh.). *Nat. Genet.* 42(10): 833-839.
- 35. Verbylaitė R, Ford-Lloyd B, Newbury J. (2006) The phylogeny of woody Maloideae (Rosaceae) using chloroplast trnL-trnF sequence data. *Biologija*. 1: 60-63.
- 36. Volkov RA, Komarova NY, Hemleben V. (2007) Ribosomal DNA in plant hybrids: inheritance, rearrangement, expression. *Syst. Biodivers*. 4(3): 261-276.
- 37. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV, Hosiawa-Baranska M, Maluszynska J, Hemleben V. (2017) Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* **17**: 21.
- 38.Xiang Y, Huang CH, Hu Y, Wen J, Li S, Yi T, Ma H. (2017) Evolution of Rosaceae fruit types based on nuclear phylogeny in the context of geological times and genome duplication. *Mol. Biol. Evol.* 34(2): 262-281.

# ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ЕВОЛЮЦІЯ IGS 5S рДНК ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *ROSA*

### Ю.О. Тинкевич, Р.А. Волков

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

E-mail: y.tynkevich@chnu.edu.ua

Ділянки геному, які кодують 5S рРНК (5S рДНК), наявні у всіх еукаріотичних організмів і являють собою привабливу модель для молекулярної дослідження механізмів еволюції тандемно організованих повторюваних послідовностей різних y таксономічних групах. Для з'ясування особливостей молекулярної еволюції 5S рДНК в роді Rosa, повторювані одиниці цих генів клоновано, сиквеновано та порівняно для чотирьох диплоїдних представників роду, а саме: R. wichurana (секція Synstylae), R. nitida (секція Carolinae), R. rugosa (секція Cinnamomeae) та R. sericea (секція Pimpinellifoliae). Показано, що в геномах більшості з цих видів є лише один варіант 5S рДНК. Разом із цим, для *R. wichurana* встановлена наявність двох варіантів IGS (intergenic spacer, IGS) з дуже низьким рівнем подібності. Обидва структурні варіанти IGS містять однакові зовнішні елементи промотора та, імовірно, транскрипційно активні.

# ВСТУП

Ділянки ДНК, наявні у геномі в кількох копіях, називають повторюваними послідовностями. Такі послідовності характерні для всіх еукаріот, але в особливо великій кількості вони зустрічаються в геномах рослин (Kubis et al., 1998). До середньоповторюваних тандемно організованих послідовностей, зокрема, належать 5S рДНК. Повторювана одиниця (повтор) 5S рДНК складається із ділянки, яка кодує 5S рРНК і міжгенного спейсера (intergenic spacer, IGS). У рослин кількість повторів 5S рДНК може коливатися від 1 до 100 тис. копій на геном і, ймовірно, є функціонально надлишковою (Schneeberger et al., 1989; Sastri et al., 1992).

Транскрипцію 5S рДНК забезпечує РНК-полімераза III, яка використовує для цього так званий «внутрішній промотор» (Cloix et al., 2003, Layat et al., 2012; Tatosyan et al., 2020). Це означає, що промотора перебувають основні (корові) елементи В межах кодувальної ділянки. Крім того, IGS може містити зовнішні елементи промотора, необхідні для збирання комплексу ініціації транскрипції (Cloix et al., 2003; Douet, Tourmente, 2007; Orioli et al., 2012). Загальна довжина IGS у рослин – від 50 до понад 800 нп. Вважається, що крім ділянок, необхідних для функціонування 5S рДНК, IGS містить послідовності, які не мають функціонального навантаження (Sastri et al., 1992; Cherevatov, Volkov, 2011; Avadhani et al., 2012).

Нині особливості структурно-функціональної організації 5S рДНК недостатньо вивчені для багатьох таксономічних груп і, зокрема, для родини Rosaceae, для якої існують лише поодинокі дані щодо будови 5S рДНК (Lim et al., 2005; Тинкевич, Волков, 2011; Тинкевич, Волков, 2014; Тупкеvich, Volkov, 2014). Важливий момент, який привертає увагу до цієї ділянки, – це можливість використання послідовності IGS 5S рДНК як маркера у молекулярній філогенетиці. Зокрема, завдяки здатності зберігати характерні для батьківських організмів риси організації (Fulnecek et al., 2002), цей маркер має унікальний потенціал у дослідженнях груп гібридного генезу, наприклад таких, як складний у таксономічному відношенні рід *Rosa* (шипшина), який містить багато видів алополіплоїдного походження (Wissemann, Ritz, 2005; Herklotz et al., 2018).

Ключем до розуміння молекулярної еволюції геномів поліплоїдних видів *Rosa* може бути вивчення генетичної структури їх імовірних диплоїдних предків, які належать до різних секцій у межах роду та розповсюджені у різних частинах земної кулі. Тому мета даної роботи – аналіз особливостей молекулярної організації та еволюції 5S рДНК у видів роду *Rosa*, з використанням раніше опублікованих нами послідовностей IGS представників цього роду (Тинкевич, Волков, 2011; Тинкевич, Волков, 2014; Тупкеvich, Volkov, 2014), та оцінка потенціалу використання цієї ділянки геному у молекулярній таксономії.

# МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження були зразки *R. nitida* Willd., *R. rugosa* Thunb., *R. sericea* Lindl та *R. wichurana* Crép. із колекцій ботанічних садів Чернівецького національного університету (Україна) та університету м. Тюбінґен (Німеччина). Загальну ДНК екстрагували згідно зі стандартним протоколом з використанням як детергенту цетавлону (Панчук, Волков, 2007).

Повторювані одиниці 5S рДНК ампліфікували за допомогою ПЛР. Для цього використовували пару універсальних праймерів 5S-14a-Not (5' - CAA TGC GGC CGC GAG AGT AGT ACT AGG ATG CGT GAC - 3') i 5S-15-Not (5' - CAT TGC GGC CGC TTA ACT TCG GAG TTC TGA TGG GA - 3'), комплементарних до кодувальної послідовності. 5'-кінці Ha праймерів ділянок розміщений сайт упізнавання рестриктази Not I (GCGGCCGC), який використовували при клонуванні отриманих ПЛР-продуктів. Застосовані праймери забезпечують ампліфікацію повного IGS та кодувальної послідовності (рис. 1). фланкувальних ділянок

Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила такі компоненти: 0,1 мкг загальної геномної ДНК, 1,0 од. акт. ДНК-полімерази (HotStartTaq DNA polymerase, QIAGEN, США), 0,1 мМ суміші дезоксирибонуклеотидфосфатів, 1<sup>×</sup> буфер для ПЛР та 0,5 мкМ кожного з двох праймерів, 5S-14a-Not i 5S-15-Not.

ПЛР проводилася з використанням ампліфікатору MiniCycler (МЈ Research Inc, США) за наступною програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95 °C, 15 хв; (2) денатурація ДНК – 94 °C, 30 с; (3) гібридизація праймерів – 57 °C, 30 с; (4) синтез ДНК – 72 °C, 40 с; (5) закінчення ампліфікації – 72 °C, 8 хв; (6) припинення реакції – 4 °C. Загальна кількість циклів ампліфікації – 35.

Для клонування ПЛР-продукти обробляли ендонуклеазою рестрикції Not I та лігували по компліментарних липких кінцях у сайт Eco52 I плазмідного вектора pLitmus 38 із використанням T4 ДНК-лігази (Thermo Fisher Scientific). Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL1-blue здійснювали методом електропорації. Клони, з рекомбінантними плазмідами, виявляли методом *blue-white colony selection* та перевіряли рестриктазним картуванням. Ферментативні реакції виконували згідно з рекомендаціями фірми-постачальника.

Рекомбінантні плазміди, які містили інсерти 5S рДНК, сиквенували з використанням Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit на сиквенаторі ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems, США). обробку отриманої нуклеотидної послідовності Первинну проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Muscle (Edgar, 2004). Пошук послідовностей у базі даних GenBank проводили, використовуючи метод BLAST (Altschul et al., 1997). Філогенетичну дендрограму будували за допомогою плагіна RAxML (Stamatakis, 2014) у середовищі програми Geneious Prime 2019.0.4.

50

# РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При розділенні ПЛР-ампліфікатів 5S рДНК методом гель-електрофорезу були отримані чіткі дискретні смужки одного або двох варіантів довжини для кожного виду. Встановлено, що для всіх досліджених видів властива наявність мажорного фрагмента розміром приблизно 500–520 нп. Крім цього, в геномі *R. nitida* виявлено мінорний фрагмент із розмірами повтору близько 320 нп. З огляду на те, що розміри кодувальної ділянки 5S рРНК високо консервативні і становлять 120 нп (Sastri et al., 1992), у досліджених нами видів шипшини довжина IGS мажорного варіанта 5S рДНК має бути у межах 380–400 нп, а короткого варіанта – приблизно 200 нп. В цілому розміри повторів 5S рДНК досліджених видів перебувають у діапазоні, характерному для вищих рослин (Sastri et al., 1992; Avadhani et al., 2012).

На наступному етапі досліджень клоновано повторювану ділянку 5S рДНК та просиквеновано 12 рекомбінантних клонів для чотирьох видів роду *Rosa* (табл. 1).

Аналіз отриманих послідовностей показав, що всі клони містять послідовність IGS, фланковану з обох кінців фрагментами кодувальної ділянки 5S рРНК. Безпосередньо з полілінкером вектору межують послідовності праймерів, використаних при проведенні ПЛР. Визначення меж кодувальної ділянки дозволило встановити розмір IGS, який у більшості клонів дорівнює 393-417 нп. Проте один із клонів *R. nitida*, Ronit3 містить вставку із IGS розміром 206 нп, що узгоджується із результатами електрофоретичного розділення ПЛР-продуктів 5S рДНК для цього виду (табл. 1). Тобто в геномі цього виду одночасно присутні два варіанти повторів 5S рДНК, які значно різняться за довжиною IGS.

Розрахунок нуклеотидного складу сиквенованих послідовностей показав, що вміст GC-пар у IGS перебуває в межах від 37 до 46 % (табл. 2). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей виявило майже повну ідентичність кодувальних ділянок як у представників роду *Rosa*, так і у інших покритонасінних рослин. На противагу цьому, в IGS знайдено значну кількість одно- та

51

багатонуклеотидних інсерцій/делецій (інделів) та точкових нуклеотидних замін (рис. 1). Особливо велика кількість мутацій відрізняє три клони *R. wichurana* – Rowic1, -2 та -3 – від послідовностей IGS інших видів, а також від послідовності клону Rowic6 цього ж виду.

**Таблиця 1.** Характеристика IGS 5S рДНК видів роду *Rosa* та підродини Rosoideae

Вид	Вид		Клон		IGS		
Ha3Ba	Поширення	Ha3Ba	GenBank Acc. No	Довжина, нп	Bміст GC-пар, %	Клас	Посилання
		Ronit2		402	37,81	α	
Rosa nitida	СПА	Ronit3		206	36,89	α	
Willd.	CIIA	Ronit4		394	38,32	α	
		Ronit5		402	37,31	α	
R. rugosa	$\mathbf{C}\mathbf{A}$	Rorug1	HQ130281.1	412	38,11	α	
Thunb.	CA	Rorug12	HQ130282.1	414	37,92	α	Па статта
R. sericea	CA	Roser5		393	39,69	α	цястантя
Lindl.		Roser6		393	39,69	α	
		Rowic1		415	43,86	β	
R. wichurana	$C\Lambda$	Rowic2	]	404	46,29	β	
Crép.	CA	Rowic3	] [	417	44,60	β	
		Rowic6		406	38,42	α	
Acaena latebrosa W.T.Aiton	ПА	White- house 122	EU931698.1	290	35,52	-	Whitchesse
<i>Cliffortia</i> graminea L.f.	ПА	White- house 18	EU931711.1	289	33,56	-	et al., unpublished
Sanquisorba officinalis L.	ПП	White- house	EU931696.1	276	36,23	-	

Скорочення: ЗЄ – західна Євразія, ЗПА – західна Північна Америка, СА – Східна Азія, СПА – східна Північна Америка, ПА – південна Африка, ПП – Північна півкуля

Вид / клон	Ronit-2	Ronit-3	Ronit-4	Ronit-5	Rorug-1	Rorug-12	Roser-5	Roser-6	Rowic-6	Rowic-1	Rowic-2	Rowic-3	A. latebrosa	C. graminea	S. officicinalis
Ronit-2	100	94,7	99,5	99,5	96,3	96,3	93,1	92,9	84,6	42,0	40,3	40,3	36,9	33,2	39,9
Ronit-3		100	92,2	94,7	93,7	94,7	91,3	91,7	75,7	38,3	37,9	38,3	35,4	39,8	36,4
Ronit-4			100	99,5	97,5	97,5	93,4	93,4	86,0	41,6	40,1	40,6	40,3	37,7	39,9
Ronit-5				100	96,3	96,3	93,1	92,9	84,6	42,0	40,3	40,3	37,6	33,9	40,2
Rorug-1					100	98,3	95,2	96,2	87,7	44,4	43,8	38,3	35,9	40,5	36,6
Rorug-12						100	95,2	96,2	87,7	44,2	43,3	43,5	40,7	39,4	36,2
Roser-5							100	96,7	84,7	43,8	41,5	42,2	32,1	30,1	37,7
Roser-6								100	85,8	44,0	43,5	43,0	37,6	33,6	34,4
Rowic-6									100	42,9	41,1	41,1	36,2	36,0	37,7
Rowic-1										100	92,6	92,8	41,4	30,8	32,6
Rowic-2											100	97,0	40,0	30,8	33,0
Rowic-3												100	38,6	33,9	34,8
A. latebrosa													100	75,8	78,6
C. graminea														100	75,7
S. officicinalis															100

**Таблиця 2.** Рівень подібності (%) IGS 5S рДНК видів роду *Rosa* та інших представників підродини Rosoideae

Примітка. Характеристики використаних для порівняння клонів подано у табл. 1

Порівняння послідовностей IGS видів роду *Rosa* і представників філогенетично спорідненої триби Sanguisorbae виявило наявність великої кількості нуклеотидних замін та кількох олігонуклеотидних інделів (рис. 2).

На основі вирівнювання нуклеотидних послідовностей визначений відсоток подібності між IGS 5S рДНК вивчених видів роду *Rosa* (табл. 1). Встановлено, що для більшості проаналізованих клонів цей показник становить 75,7–97,5 %. Проте три вищезгадані послідовності IGS *R. wichurana* (клони Rowic1, -2, -3) демонструють значно нижчий рівень подібності, від 41,1 до 42,9 %, при порівнянні з іншими клонами. Така значна відмінність дає підставу говорити про існування в геномі *R. wichurana* двох структурних класів повторів 5S рДНК, які ми умовно назвали  $\alpha$  та  $\beta$ .

		10	20	30	40	50
Consensus Ronit2	C <b>TTTTTT</b> AT-	TTTTT	TTTTTTG	TTTCGGT1 	CATT-AAGTT-	-+ 
Ronit4					····-	
Rorug1		TTTT			•••••	
Roser5	·····				· · · · · - · · · · · · · · · · · · · ·	
Roser6 Rowic6		TC.	c	AC.		
Rowic1 Rowic2 Rowic3	GCC GCC	TTTGGC TTTGAC TTTGAC	C.CACAC C.CGCAC C.CGCAC	TATTT TATTTA TATTTA	TTTTP T TTTTTP	4Τ  4Τ
		60	70	80	90	100
Consensus	GCTTT	TTT-GATTI	CGGCTACTT	IGTCCATGTAC	TAATTCAATCC	:A
Ronit3						
Ronit5				• • • • • • • • • • • • •		•
Rorug12			••••	• • • • • • • • • • • • •	•••••	•
Roser6		···- ···-	c	• • • • • • • • • • • • •		•
Rowic6 Rowic1	TTCCCC		•••••	CTTGC	CGGG	•
Rowic2 Rowic3	TTCCCC	T T	•••••	CT.GCG.	CGGG	•
		110 +	120	130	140	150 +
Consensus Ronit2	ACTCTTCGA	AGGCTTGTG	AGATTGAAG	GAAAGCTCACC	GGCCGCGGAGA	.т •
Ronit3 Ronit4						•
Ronit5 Rorug1	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	 			.A	:
Rorug12 Roser5						:
Roser6 Rowic6		 		G		•
Rowic1 Rowic2	GT. G.CTG	CCA	CCGTGC.C	CGGC.A.TGTA	CC.AA.GC.	c
Rowic3	GTG	CA	CCGTGC.C	GGC.A.TGTA	CA.AA.GC.	C

Рис. 1 (початок). Структурна організація міжгенного спейсера 5S рДНК видів роду Rosa. Виділено потенційні зовнішні елементи підкресленим промотора; жирним шрифтом позначено IGS; курсивом консервативні ділянки В оліго-dT показана Характеристики послідовність термінатора. використаних для вирівнювання клонів наведено у табл. 1

		160	170	180	190	200
Consensus	TAGATATG	TTAAGACG	C <u>AAAAGAT</u>	TGGCCTTGGG	CCTT-GGGG	CTCTT
Ronit2 Ronit3 Ronit4	<u></u>	<u></u>	G	<u></u>	: :	<u></u>
Ronit5 Rorug1 Rorug12			=		····-···	
Roser5 Roser6					т 	
Rowic6 Rowic1 Rowic2 Rowic3	A		ГСА ГСА		····-	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
ROWICS	A	210	220	230	240	250+
Consensus Ronit2	<u>GGGCTT</u> TG	TTTGATCGA	AGGAGTTGTT	TTTGCTAGAT	TTTTTTATTC	ATTTA
Ronit3 Ronit4						
Rorug1 Rorug12						
Roser6	A		c		G	
Rowic6 Rowic1 Rowic2	C c	CC.A.	ATA.A ATA.A	CGA	CA.C	.C.AT .C.AT
Rowic3	C	CC.A. 260	ATA.A 270	CGA 280	CA.C 290	.C.AT 300
Consensus Ronit2	TTTTGTTT	-+ TAAATTTTT	ATATTTATT	TTCATTTTCT	AACAGCAAT	AAAAG
Ronit2 Ronit3 Ronit4 Ronit5 Rorug1 Rorug12			· · · · · · · · · · · · · · ·		c	
			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			  
Roser5 Roser6	·····				•••••	
Rowic6 Rowic1 Rowic2 Rowic3	A T	GG .TT A.	GAGG. GAGG.	ACGGAAGO ACAGAAGO ACAGAAGO	GGGGA.GGGG GGG.A.GGGC GGGGA.GGGC	GCT.C GCC.C GCT.C

Рис. 1 (продовження). Структурна організація міжгенного спейсера 5S рДНК видів роду *Rosa* 

		310	320	330	340	350
Consensus Ronit2 Ronit3 Ronit4 Rorug12 Roser5 Roser6 Rowic6 Rowic1 Rowic2 Rowic3	TGTATCCC	GGCGGGXGAGG A AA AA	TGGTGCGGTTO TGGTGCGGTTO 	GCGTAA.GT	CTAAAAACTTT 	+ C · · · · · · ·
		360	370	380	390	400
Consensus Ronit2 Ronit3 Ronit4 Rorug1 Rorug12 Roser5 Roser6 Rowic6 Rowic1 Rowic2 Rowic3	ATAAGCTTO	GGGGTAATGTA TTTCG.T.T TTTTG.T.T TTTTG.T.T 410	ATGGAAGC7	ACTTTA    	GGGAGCTGAGC	G • • • • • • • • • • • • • • • • • • •
Consensus Ronit2 Ronit3 Ronit4 Ronit5 Rorug1 Rorug12 Roser5 Roser6 Rowic6 Rowic6 Rowic1 Rowic2 Rowic3	AAGGGAGTT AAGGGAGTT AAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TATATAGATT	rgattxcgcat 	'ACACTAAĈ G. 		

Рис. 1 (закінчення). Структурна організація міжгенного спейсера 5S рДНК видів роду *Rosa* 



вирівнювання Рис. 2. Схематичне зображення нуклеотидних послідовностей роду IGS 5S рДНК видів Rosa та триби Sanguisorbae. Характеристики використаних для порівняння клонів подано у табл. 1. Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: — – менше 60 %, — – 60-80 %, -80-100%, -100%

У покритонасінних рослин рівень подібності IGS нижче за 50 %, як правило, характерний для послідовностей 5S рДНК представників різних родів і рідко зустрічається в межах одного роду (Ma et al., 2000; Fulnecek et al., 2002). Більше того, у представників різних родів (A. latebrosa, C. gramineae, Sanquisorbeae S. officinalis) триби подібність IGS перебуває в межах від 75,7 до 78,6 % (табл. 2), тобто відчутно вища, ніж подібність між різними структурними класами IGS R. wichurana. Водночас, рівень подібності між видами роду Rosa, розрахований окремо для класу, має типові для родів α покритонасінних межі, від 75,7 до 99,5 %. Низький рівень подібності IGS структурних класів а та β дає змогу припустити, що ці два структурні класи 5S рДНК виникли досить давно, ймовірно на ранніх етапах видоутворення в роді Rosa. В подальшому структурні класи α β у геномі *R. wichurana* еволюціонували незалежно, тобто та гомогенізація між ними не відбувалася. В інших досліджених нами видів *Rosa* клас β міг бути вторинно втрачений.

Детальний аналіз 5S рДНК різних видів роду *Rosa* виявив відносно консервативні ділянки, які зберігають гомологію навіть між IGS, котрі належать до різних структурних класів (рис. 1). Встановлено, що в середньому рівень подібності цих консервативних ділянок удвічі вищий, ніж варіабельних.

Поясненням сповільненої еволюції окремих зон IGS може бути розташування у них структурних елементів, які мають певне функціональне навантаження, наприклад, таких, які беруть участь в ініціації та термінації транскрипції 5S рРНК (Venkateswarlu et al., 1991; Cloix et al., 2003; Orioli et al., 2012). Проведений порівняльний аналіз послідовностей дійсно підтвердив, що в IGS всіх досліджених нами клонів 5S рДНК наявні мотиви, котрі відповідають потенційним зовнішнім елементам промотора та термінатора РНК-полімерази III (рис. 2). Так, до сигналів, задіяних у ініціації транскрипції, у видів роду Rosa можна віднести шестинуклеотидний мотив ТАТАТА, розміщений на 3'-кінці IGS в позиції -28 нп від 5'-кінця кодувальної ділянки, а також мотиви GC та C в позиціях -12 та -1 нп, відповідно. безпосередньо після кодувальної ділянки Також в IGS BCIX сиквенованих клонів виявлено оліго-dT послідовність, яка виконує функцію термінатора транскрипції РНК-полімерази III (Cloix et al., 2003). Тобто, у IGS обох структурних класів 5S рДНК наявні всі типові мотиви, які беруть участь у ініціації та термінації транскрипції. Отже, обидва ідентифіковані нами класи 5S рДНК видаються функціонально активними.

У центральній частині IGS локалізується ще одна високо якій рівень подібності зона, В консенсусних консервативна послідовностей двох структурних класів 5S рДНК становить 92,0 %, що є найвищим показником у IGS (див. табл. 2). Більшу частину цієї зони у трьох із чотирьох досліджених видів Rosa займають чотири диверговані субповтори, які короткі не містять жодних класоспецифічних мутацій (рис. 3). Проте в IGS R. nitida другого субповтору немає. У представників інших родів підродини Rosoideae в центральній частині IGS також наявна область, яка складається з

58

трьох субповторів (рис. 3). Цікаво зазначити, що консенсусна послідовність цих субповторів, TTGGGC, ідентична з частиною послідовності внутрішнього промотора РНК-полімерази ІІІ у кодувальній ділянці 5S рРНК.

Вважається, що геологічний вік підродини Rosoideae становить 50,0 – 66,5 млн років (Dobeš, Paule, 2010). Можна було б очікувати, що за такий тривалий час у центральній частині IGS мала б накопичитися мутацій, адже ЦЯ ділянка наймінливіша кількість значна V представників інших родин покритонасінних рослин (Yang et al., 1998; Volkov et al., 2001; Baum et al., 2013). Тобто наявність еволюційно консервативних субповторів у центральній частини IGS підродини Rosoideae несподівана представників i потребує подальшого вивчення.

	$\rightarrow$	$\longrightarrow$	$\longrightarrow$	$\rightarrow$
Consensus	TTGGCC	TTGGGCC	-TTGGGGCTC	TTGGGC
R. nitida 2				
R. nitida 3				
R. nitida 5				
R. rugosa 1				
R. rugosa 12				
R. sericea 5			т	
R. sericea 6				A
R. wichurana 6				
R. wichurana 1				
R. wichurana 2				
R. wichurana 3				
Acaena latebrosa	.G			.G
Cliffortia graminea	.A		<b>TAT</b>	A
Sanguisorba officinalis	.A			• • • • • •

**Рис. 3.** Вирівнювання субповторів центральної частини IGS 5S рДНК видів роду *Rosa* та триби Sanguisorbeae

В IGS «короткого» клону Ronit3 (який за наявною нуклеотидною послідовністю відповідає класу  $\alpha$ ) зона субповторів разом із більшою частиною спейсера втрачена через масштабну делецію. Проте, на 5'- та 3'-кінцях IGS збереглися ділянки, які потенційно можуть брати участь у ініціації та термінації транскрипції. Отже, наявні дані не дають змоги відкинути можливість, що короткі мінорні повтори 5S рДНК *R. nitida* функціонально активні (рис. 1).

Отримані нуклеотидні послідовності IGS були використані для побудови філогенетичної дендрограми, яка відображає спорідненість видів роду *Rosa* та родів філогенетично близької триби Sanquisorbeae (рис. 4). Як видно на дендрограмі, послідовності α-класу всіх досліджених видів та послідовності β-класу *R. wichurana* утворюють дві сестринські клади з максимально можливою статистичною підтримкою. Філогенетичні дистанції між послідовностями різних структурних класів значно перевищують такі між клонами, які належать до одного класу. Індивідуальні клони α-класу з геномів різних видів утворюють підгрупи в межах відповідної клади.



**Рис. 4.** Філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Rosa* та триби Sanguisorbae методом максимальної правдоподібності з використанням GTR моделі заміщення. Цифри біля вузлів відповідають бутстреп-підтримці, розрахованій у відсотках для 1000 реплікацій

Хоча всі чотири досліджені види шипшин належать до різних секцій, за результатами порівняльного аналізу IGS вони демонструють достатньо високий рівень спорідненості. Особливо близькі *R. rugosa* та *R. nitida*, які представляють, відповідно, секції

Cinnamomeae та Carolinae. Таке положення узгоджується з високим відсотком подібності між клонами цих видів. Аналогічні результати отримані і при використанні інших молекулярних маркерів, як для *R. nitida*, так і для іншого представника цієї секції – *R. carolina* (Wissemann, Ritz, 2005; Joly, Bruneau, 2006; Fougère-Danezan et al., 2015). За даними більшості досліджень дистанції між видами секцій Cinnamomeae та Carolinae не перевищують такі в межах секції Сіппатотеае. Загалом, як наші дані, так і дані інших авторів, вказують на штучний характер виділення секції *Carolinae*. Оскільки всі види цієї секції зустрічаються тільки у Північній Америці, а багато інших видів Cinnamomeae секції R. rugosa, ЯК i розповсюджені у східній Азії, філогенетичну близькість між цими секціями можна пояснити тим, що предки сучасних видів секції Carolinae могли мігрувати зі східної Азії у Північну Америку через Берінгію у недалекому геологічному минулому.

## ВИСНОВКИ

Отже, у геномі видів роду *Rosa* 5S рДНК може бути представлена одним або двома структурними класами, α та β, які мають майже однакову довжину, але значно відрізняються за послідовністю IGS. Водночас кодувальна ділянка обох класів не відрізняється. У деяких представників роду *Rosa* в межах структурного класу α зустрічаються два варіанти повторів 5S рДНК: довгий (~ 500 нп) мажорний та короткий (~ 300 нп) мінорний, який виник унаслідок делеції центральної частини IGS.

Різні зони IGS 5S рДНК відрізняються за швидкістю молекулярної еволюції. Консервативними є послідовності, які межують з кодувальною ділянкою та беруть участь у ініціації та термінації транскрипції. Крім того, у представників підродини Rosoideae в центральній частині IGS виявлено консервативну зону, яка складається з коротких субповторів.

Значна подібність IGS вказує на філогенетичну близькість представників секцій *Сіппатотеае* та *Carolinae*.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 1. Панчук II, Волков РА. (2007) Практикум з молекулярної генетики. *Чернівці: Рута*.
- 2. Тинкевич ЮО, Волков РА. (2011) Структурна організація 5S рибосомальної ДНК *Rosa nitida* Wild. *Bich. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* **9**(2): 276-282.
- 3. Тинкевич ЮО, Волков РА. (2011) Структурна організація повторюваної ділянки 5S рДНК *Rosa sericea* Lindl. *Біологічні системи*. **3**(4): 315-321.
- 4. Тинкевич ЮО, Волков РА. (2014) Новий структурний клас 5S рДНК *Rosa wichurana* Crep. *Доповіді НАН України*. **5**: 143-148.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- 6. Avadhani MNM, Selvaraj IC, Tharachand C, Rajasekharan PE. (2012) Molecular characterization of medicinal and aromatic plants by 5S rRNA NTS and PCR RFLP-A mini review. *Research in Biotechnology*. 3(2): 41-48.
- 7. Baum BR, Edwards T, Johnson DA. (2013) What does the 5S rRNA multigene family tell us about the origin of the annual Triticeae (Poaceae)? *Genome*. 56(5): 245-266.
- 8. Cherevatov OV, Volkov RA. (2011) Organization of 5S ribosomal DNA of *Melitaea trivia*. *Cytol. Genet.* **45**(2): 115-120.
- 9. Cloix C, Yukawa Y, Tutois S, Sugiura M, Tourmente S. (2003) In vitro analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant J*. **35**(2): 251-226.
- 10. Dobeš C, Paule J. (2010) A comprehensive chloroplast DNA-based phylogeny of the genus *Potentilla* (Rosaceae): implications for its geographic origin, phylogeography and generic circumscription. *Mol. Phylogenet. Evol.* **56**(1): 156-175.
- 11. Douet J, Tourmente S. (2007) Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*. **99**: 5-13.

- 12. Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32** (5): 1792-1797.
- 13. Fougère-Danezan M, Joly S, Bruneau A, Gao XF, Zhang LB. (2015) Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids. *Ann. Bot.* **115**(2): 275-291.
- 14. Fulnecek J, Lim KY, Leitch AR, Kovarík A, MatyásekR. (2002) Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity* (*Edinb.*). 88(1): 19-25.
- Herklotz V, Kovařík A, Lunerová J, Lippitsch S, Groth M, Ritz CM. (2018) The fate of ribosomal RNA genes in spontaneous polyploid dogrose hybrids (*Rosa* L. sect. Caninae (DC.) Ser.) exhibiting non symmetrical meiosis. Plant J. **94**(1): 77-90.
- Joly S, Bruneau A. (2006) Incorporating allelic variation for reconstructing the evolutionary history of organisms from multiple genes: an example from *Rosa* in North America. *Syst. Biol.* 55(4): 623-636.
- 17. Kubis SE, Heslop-Harrison JS, Desel C, Schmidt T. (1998) The genomic organization of non-LTR retrotransposons (LINEs) from three *Beta* species and five other angiosperms. *Plant Mol. Biol.* **36**: 821–831.
- 18. Layat E, Sáez-Vásquez J, Tourmente S. (2012) Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis. Plant Cell Physiol.* 53(2): 267-276.
- 19.Lim KY, Werlemark G, Matyasek R, Bringloe JB, Sieber V, El Mokadem H, Meynet J, Hemming J, Leitch AR, Roberts AV. (2005) Evolutionary implications of permanent odd polyploidy in the stable sexual, pentaploid of *Rosa canina* L. *Heredity* (*Edinb.*). **94**(5): 501-506.
- 20. Ma XQ, Duan JA, Zhu DY, Dong TTX, Tsim KWK. (2000) Species identification of *Radix astragali* (Huangqi) by DNA sequence of its 5S rRNA spacer domain. *Phytochemistry*. **54**(4): 363-368.

- 21. Orioli A, Pascali C, Pagano A, Teichmann M, Dieci G. (2012) RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene*. **493**(2): 185-194.
- 22. Sastri DC, Hilu K, Appels R, Lagudah ES, Playford J, Baum BR. (1992) An overview of evolution in plant 5S DNA. *Plant Syst. Evol.* **183**: 169-181.
- 23. Schneeberger RG, Creissen GP, Cullis CA. (1989) Chromosomal and molecular analysis of 5S RNA gene organization in the flax, *Linum usitatissimum*. *Gene*. **83**(1): 75-84.
- 24. Stamatakis A. (2014) RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. **30**(9): 1312-1313.
- 25. Tatosyan KA, Stasenko DV, Koval AP, Gogolevskaya IK, Kramerov DA. (2020) TATA-like boxes in RNA polymerase III promoters: requirements for nucleotide sequences. *Int. J. Mol. Sci.* 21(10): 3706.
- 26. Tynkevich YO, Volkov RA. (2014) Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* **48**(1): 1-6.
- 27. Venkateswarlu K, Lee SW, Nazar RN. (1991) Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene*. 105(2): 249-254.
- 28. Volkov RA, Zanke C, Panchuk II, Hemleben V. (2001) Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding, *Theor. Appl. Genet.* **103**(8): 1273-1282.
- 29. Wisseman V, Ritz CM. (2005) The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS–1 and atpB–rbcL intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. *Bot. J. Linn. Soc.* **147**(3): 275-290.
- 30. Yang YW, Tseng PF, Tai PY, Chang CJ. (1998) Phylogenetic position of *Raphanus* in relation to *Brassica* species based on 5S rRNA spacer sequence data. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **39**: 153-160.

## МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК У ТАКСОНОМІЇ РОДУ *LATHYRUS*

#### Ю.О. Тинкевич, І.І. Чорней, Р.А. Волков

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Серед представників роду Lathyrus флори України є три рідкісні занесені до Червоної книги. Контроль їх чисельності ВИДИ. ускладняється природним схрещенням зі спорідненими видами з утворенням морфологічно подібних гібридних форм. Тому використання молекулярних маркерів, таких як послідовність міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS) 5S рДНК, необхідне для оцінки генетичної однорідності популяцій таких видів та розробки раціональної стратегії їх збереження. Нами проведено ПЛР-ампліфікацію, клонування та сиквенування нуклеотидної послідовності IGS 5S рДНК чотирьох видів роду *Lathyrus*. Встановлено, що IGS представників роду має невелику довжину (154-163 нп) та низький вміст GC-пар (22,64–26,54 %.) У фрагменті IGS, який передує ділянці, котра кодує 5S рРНК, ідентифіковано характерні для Покритонасінних елементи зовнішнього промотора РНК полімерази III. Серед представників 17 родів родини Fabaceae найвищий рівень подібності до послідовностей IGS Lathyrus виявлено для двох видів роду Pisum. Висока мінливість IGS 5S рДНК робить його зручним молекулярним маркером ДЛЯ таксономічних досліджень роду Lathyrus L.

65

## ВСТУП

Рід Чина (Lathyrus L.) об'єднує у своєму складі багаторічні трав'яні, рідше однорічні рослини з крилатими або безкрилими стеблами і парно-перистопірчастоскладними листками та належить ДО еволюційно просунутої і високоспеціалізованої триби Fabeae (бобові) родини Fabaceae Lindl. та налічує понад 160 видів (Asmussen, Liston, 1998). Рід Lathyrus є досить поліморфним за багатьма ознаками: основною біоморфою рослин, будовою листка й листкової осі, формою листочків, плодів і насіння, забарвленням квіток та ін. До того ж багатьом видам чин, наприклад, L. sativus L., L. sylvestris L., L. tuberosus L. та ін., властивий внутрішньовидовий поліморфізм (Бурляева, Вишнякова, 2010). Представники роду трапляються у різноманітних біотопах переважно помірної зони північної півкулі. В Україні росте 31 вид цього роду, які належать до трьох підродів та 16 секцій, причому два з них – *L. sativus* (чина посівна) та *L. odoratus* L. (чина запашна) – вирощують в культурі. І загалом для багатьох видів цього роду властива велика господарська та селекційна цінність (Крицька, 2014).

Варто зазначити, що три види роду *Lathyrus* занесені до Червоної книги України (2009): *L. laevigatus* (Waldst. et Kit.) Gren. (чина гладенька), *L. transsilvanicus* (Spreng.) Rchb. (чина трансільванська) та *L. venetus* (Mill.) Wohlf. (чина венеціанська, або чина ряба). Це переважно лісові види, популяції яких опинилися під загрозою знищення через інтенсивну експлуатацію лісових масивів в останні десятки років. Усі ці три види належать до секції *Orobus* (L.) Gren. & Godr. підроду *Orobus* (L.) Peterm. який був початково описаний К. Ліннеєм (Linnaeus, 1753) в ранзі роду.

Особливо небезпечна ситуація склалася із чиною венеціанською: популяції цього виду критично малочисельні, а багато з них за останній час зникли. За останніми даними, поширення цього виду обмеженіше, ніж вважалося раніше, а більшість відомих популяцій насправді представлена гібридними формами між *L. venetus* та поширеним близько спорідненим видом *L. vernus* (Червона книга України, 2009). Зазначені види виділені в окрему підсекцію – *Montani* Czefr., вони досить подібні за морфологічними ознаками, ценотичною приуроченістю і відрізняються за часом проходження окремих фенофаз.

Для розробки ефективних заходів щодо збереження популяцій рідкісних видів, зокрема чини венеціанської, та відновлення їх чисельності важливо мати достовірну інформацію про їхній сучасний стан та чітко диференціювати від морфологічно подібних гібридних форм та споріднених видів. Ефективний метод для такої диференціації – це застосування молекулярних маркерів, один із яких – нуклеотидна послідовність міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS) 5S рДНК.

Ділянки 5S рДНК належать до класу тандемно організованих послідовностей, утворюють повторюваних які кластери, локалізовані на одній чи кількох хромосомах. У судинних рослин кількість повторів 5S рДНК становить від сотень до десятків тисяч на геном (Cloix et al., 2000). До складу кожної повторюваної одиниці належать еволюційно консервативна ділянка, яка кодує 5S рРНК та варіабельний IGS. Мутації, які виникають у IGS, переважно мають нейтральний характер, що дає їм змогу уникати дії добору та призводить до їх накопичення. Завдяки високому темпу еволюції різниця у послідовності IGS спостерігається навіть між близькоспорідненими видами, а інколи і між особинами у популяціях (Volkov et al., 2001; Simeone et al., 2018).

Особливість еволюції тандемно-організованих повторюваних послідовностей – явище концертної (узгодженої) еволюції (Coen et al., 1982). Це явище полягає у здатності до гомогенізації усіх послідовностей у межах кластера, а інколи – і між кластерами. Для 5S рДНК гомогенізація, особливо між послідовностями з різних кластерів, не завжди відбувається швидко й ефективно, внаслідок чого можливе одночасне існування в геномі двох і більше варіантів 5S рДНК, які відрізняються за нуклеотидною послідовністю

67

(Fulnecek et al., 2002; Tynkevich et al., 2014; Ishchenko, Panchuk, 2018).

Дотепер про організація IGS 5S рДНК у представників роду Lathyrus та більшості споріднених груп майже нічого не відомо, за винятком хромосомної локалізації кластерів цих генів (Chalup et al., 2014) та нуклеотидної послідовності IGS, описаної нами раніше для одного виду – L. venetus (Tynkevich et al., 2015). Проте, для того, щоб оцінити можливість використання послідовності IGS у ролі молекулярного маркера у таксономічних дослідженнях, важливо визначити такі параметри, як розміри, структурна організація та еволюційний поліморфізм цієї ділянки геному у представників різних груп цього роду. Тому метою даної роботи було клонування, розшифрування та аналіз нуклеотидної послідовності IGS повторів 5S рДНК видів роду Lathyrus та її порівняння з гомологічною ділянкою інших представників родини Fabaceae.

# МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження були зразки *L. venetus, L. niger, L. subalpinus* та *L. tuberosus* з колекції Гербарію Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича (CHER). Загальну ДНК екстрагували з гербаризованого листя згідно зі стандартним протоколом (Панчук, Волков, 2007).

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для цього використовували пару універсальних праймерів 5S-14a-Ph (5'-GCG AGA GTA GTA CTA GGA TGC GTG AC-3') і 5S-15 (5'-GCT TAA CTT CGG AGT TCT GAT GGG A-3'), комплементарних до ділянки, яка кодує 5S рРНК у дводольних рослин (Volkov et al., 2001). Праймер 5S-14a-Ph містив на 5'-кінці фосфатну групу, що дозволяє збільшити ефективність лігування при клонуванні ПЛР-продуктів за тупим кінцем. Застосовані праймери забезпечують ампліфікацію повного IGS та фланкувальних ділянок кодувальної послідовності. Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила такі компоненти: 10–30 нг загальної геномної ДНК, 1,0 од. акт. ДНКполімерази Maxima DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, США), 0,1 мМ суміші дезоксирибонуклеотидфосфатів, 1х буфер для ПЛР та 0,5 мкМ кожного з двох праймерів.

ПЛР проводилася з використанням ампліфікатору MiniCycler (МЈ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95 °C, 15 хв; (2) денатурація ДНК – 94°C, 45 с; (3) гібридизація праймерів – 57 °C, 45 с; (4) синтез ДНК – 72°C, 1 хв; (5) закінчення ампліфікації – 72 °C, 10 хв; (6) припинення реакції – 4 °C. Загальна кількість циклів ампліфікації – 35.

Для клонування ПЛР-продукти обробляли рестриктазою BamHI (Thermo Fisher Scientific), сайт упізнавання якої присутній у ділянці, що кодує 5S рРНК у вищих рослин. Після цього продукти рестрикції лігували з використанням Т4 ДНК-лігази (Thermo Fisher Scientific) за утвореним липким кінцем та фосфорильованим тупим кінцем у плазмідний вектор pBlueSkript II KS (+), попередньо розщеплений рестриктазами BamHI та EcoRV. Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL-blue проводили методом електропорації з використанням приладу *E. coli* Pulser (BioRad, CША). Рекомбінантні клони виявляли методом blue-white colony selection. Плазміди виділяли з нічної культури методом лужного лізису (Sambrook et al., 1989). Для перевірки наявності вставки плазміди обробляли парою рестриктаз HindIII та BamHI, сайти впізнавання яких розміщені з двох сторін від полілінкеру. Ферментативні реакції здійснювали згідно з рекомендаціями фірми-постачальника.

Рекомбінантні плазміди зі вставками 5S рДНК сиквенували на фірмі GATC (Німеччина). Первинну обробку отриманої нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR (DNASTAR, 1998). Для вирівнювання послідовностей застосовували метод Muscle (Edgar, 2004). Пошук послідовностей у базі даних Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST (Altschul et al., 1997).

# РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Унаслідок клонування повторюваної ділянки 5S рДНК для чотирьох видів роду *Lathyrus* ідентифіковано 19 зразків плазмідної ДНК зі вставкою, з яких вісім відібрано для сиквенування. Комп'ютерна обробка отриманих в результаті сиквенування послідовностей показала, що всі клони містять IGS 5S рДНК, фланкований з обох сторін фрагментами кодувальної послідовності. Визначення меж кодувальної ділянки дозволило встановити розміри IGS, котрі варіюють від 154 до 163 нп (табл. 1). Для IGS представників роду *Lathyrus* властивий низький вміст GC-пар – від 22,64 до 27,92 % (табл. 1) – порівняно з більшістю Покритонасінних рослин (Ishchenko, Panchuk, 2018; Shelyfist et al., 2018; Tynkevich, Volkov, 2019).

Вирівнювання послідовностей IGS видів роду *Lathyrus* та двох видів філогенетично найближчого роду *Pisum* (Smýkal et al., 2011; Robledillo et al., 2020) методом Muscle (Edgar, 2004) показало, що деякі послідовності відрізняються одно- та олігонуклеотидними делеціями/інсерціями (інделами) (рис. 1). Проте набагато більше трапляється точкових нуклеотидних замін. Особливо значна їхня кількість виокремлює клони видів *L. niger* та *L. subalpinus* з-поміж усіх інших. Водночас, у просиквенованих нами фрагментах кодувальної ділянки 5S рДНК знайдено лише поодинокі точкові мутації.

Пошук важливих для ініціації транскрипції елементів показав, що в IGS видів роду *Lathyrus* та *Pisum* наявні сигнали, які відповідають зовнішнім регуляторним елементам промотора 5S рДНК (Douet, Tourmente, 2007). До таких сигналів належить шестинуклеотидний мотив ТАТАТА, розміщений на 3'-кінці IGS в позиції -28 нп від 5'-кінця кодувальної ділянки, а також мотиви GC та C у позиціях -12 нп та -1 нп, відповідно.

Також безпосередньо після З'-кінця кодувальної ділянки локалізована оліго-Т послідовність, яка виконує функцію термінатора транскрипції РНК-полімерази III (Cloix et al., 2003;

Douet, Tourmente, 2007; Orioli et al., 2012). Найменш консервативним із усіх регуляторних мотивів у IGS виявився GC-динуклеотид. У чотирьох проаналізованих клонах в ньому наявна транзиція C→T.

	Клон / фраг	тмент ДНК	IC	GS	
Вид	Назва	GenBank Acc. No	Довжина, нп	GC- вміст, %	Посилання
<i>Lathyrus niger</i> (L.) Bernth.	Lanig1	-	162	26,54	
Lathyrus	Lasub1		163	25,15	
subalpinus Beck	Lasub2	_	162	25,31	
	Letub1		154	27,92	Ия стаття
Lathyrus tuberosus L	Letub3	-	159	23,90	
	Letub11		159	26,42	
Lathyrus	Laven1		163	22,70	
Wohlf.	Laven2	_	159	22,64	
<i>Pisum sativum</i> L.	p5Ss	AY499178.1	158	27,22	Ellis et al., 1988
<i>Pisum fulvum</i> Sibth. & Sm.	Piful (ERR3016302. 4765293.1)	ERR3016302. 4765293.1	159	27,04	Kreplak et al., 2019; This paper
Trifolium subterraneum L.	-	AM258986.1	211	27,49	Falistocco, 2006, Unpublished
Medicago arborea L.	clone 1	KF435091.1	197	24,87	Galian et al., 2014
Vigna unguiculeta (L.) Walp.	-	AF141141.1	214	39,25	Machuka et al., 1999, unpublished
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	-	X15199.1	210	39,52	Gottlob- McHugh et al., 1990

**Таблиця 1.** Характеристика IGS 5S рДНК видів роду *Lathyrus* та представників деяких інших родів родини Fabaceae


**Рис. 1.** Структурна організація IGS 5S рДНК видів роду *Lathyrus* та *Pisum*. Pr1 та Pr2 – праймери 5S-L та 5S-R, відповідно. Виділено потенційні зовнішні елементи промотора; жирним курсивом вказано оліго-Т послідовність термінатора; стрілками позначено розташування субповторів у IGS. Характеристики використаних для вирівнювання клонів подано у табл. 1

Аналіз структурних особливостей 5S рДНК показав, що у IGS видів роду *Lathyrus* та *Pisum* є кілька коротких (4–5 нп) прямих повторів, які, ймовірно, виникли як результат тандемних дуплікацій. Крім того, один із наявних у базі даних Genbank клонів 5S рДНК *P. sativum* (АҮ499177.1) на початку IGS містить тандемну дуплікацію завдовжки 50 нп (рис. 1). Цікаво, що подібна за розміром та розташуванням дуплікація була раніше описана також для 5S рДНК деяких представників роду *Quercus* (Tynkevich, Volkov, 2019). Проте у досліджених видів роду *Lathyrus* нами не знайдено варіантів IGS із аналогічними дуплікаціями.

Для порівняння структурної організації IGS представників роду *Lathyrus* та інших таксонів родини Fabaceae було проведено пошук у базі даних GenBank, який виявив послідовності 5S рДНК для представників 17 родів цієї родини: *Albizia* Durazz., *Astragalus* L., *Callistachys* Vent., *Gastrolobium* R. Br., *Glycine* (L.) Merr., *Jansonia* Schürhoff, *Hedysarum* L., *Medicago* L., *Lens* Mill., *Lotus* L., *Lupinus* L., *Pediomelum* Rydb., *Phaseolus* L., *Pisum* L., *Podolobium* R. Br., *Trifolium* L. та *Vigna* Savi. Однак лише для п'яти родів, які разом із родом *Lathyrus* належать до підродини Faboideae, рівень подібності IGS був достатнім для коректного вирівнювання послідовностей ДНК (рис. 2, табл. 2).

Виявилося, що в межах IGS ділянки високої гомології (до 100 % у всіх видів) локалізуються переважно на його 5' та 3' кінцях (рис. 2), де розміщені сигнали, необхідні для транскрипції. функціональне сигналів, Враховуючи значення ших можна припустити, послідовності зберігаються ШО цi завдяки лії стабілізаційного добору.

Зіставлення послідовностей IGS видів роду Lathyrus та інших представників підродини Faboideae показало (табл. 2), що найвищий рівень подібності спостерігається між послідовністю короткого варіанта IGS Pisum sativum та клоном Letub3 – 88,0 %. Водночас гомологія між послідовностями IGS Lathyrus та Pisum, з одного боку, та інших представників підродини Faboideae, з іншого, не перевищує 56,5 %. Послідовності IGS представників решти 12 родів бобових, котрі належать до інших підродин, ще більше відрізнялися роду Lathyrus віл IGS вилів за довжиною за рахунок полінуклеотидних інделів та/або мали рівень подібності менше, ніж 30 %.



**Рис. 2.** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК видів роду *Lathyrus* та представників деяких інших родів родини Fabaceae. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1. Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: — – менше 60 %, — – 60–80 %, — – 80–100 %, — – 100%

Оскільки роди *Lathyrus* та *Pisum* належать до однієї триби Fabeae (Schaefer, 2012), значно вища подібність між послідовностями IGS 5S рДНК представників цих родів порівняно з іншими видами бобових цілком очікувана. Аналіз також показує, що у представників одного чи кількох близькоспоріднених родів (в межах одної триби) послідовність IGS 5S рДНК зберігає достатній для коректного порівняння рівень гомології. Аналогічну тенденцію встановлено нами раніше для представників триб Roseae та Sanquisorbae родини Rosaceae (Tynkevich, Volkov, 2014).

Враховуючи рівень гомології, для філогенетичного аналізу нами відібрані послідовності IGS 5S рДНК тільки двох родів – *Lathyrus* та *Pisum*. У ролі зовнішньої групи була використана послідовність IGS *Trifolium subterraneum*.

**Таблиця 2.** Рівень подібності (%) IGS 5S рДНК видів роду *Lathyrus* та представників інших родів родини Fabaceae

Вид / клон	լջinsı	- Iqnsv7	zqnsv7	[dut9]	Letub3	Letubll	[บองง7	гиәлөү	<b>พมงประ</b> .4	աուլոք .4	muənnrətduz .T	тиэлодль .М	ntsiluziugan . <sup>V</sup>	c. max
Lanigl	100	90,7	95,1	69,2	69,8	69,8	68,8	69,2	69,6	67,3	47,5	48,0	32,7	37,0
Lasubl		100	92,6	69,2	69,8	69,2	69,4	70,4	69,6	67,3	49,1	48,3	33,1	40,5
Lasub2			100	69,8	70,4	70,4	69,4	69,8	70,3	67,3	46,2	45,3	34,0	39,5
Letubl				100	89,3	95,6	89,9	88,1	87,3	83,0	51,0	53,1	35,2	41,5
Letub3					100	89,9	92,5	89,3	88,0	85,5	54,1	53,7	35,2	39,6
Letub11						100	90,6	86,8	87,3	83,0	52,9	53,7	35,8	42,1
Laven1							100	88,1	86,7	83,0	56,5	53,6	35,6	39,9
Laven2								100	85,4	80,5	52,9	55,8	33,3	40,3
Pisum sativum									100	82,3	51,3	50,7	34,8	39,9
P. fulvum										100	52,2	50,3	35,2	38,4
Trifolium subterraneum											100	51,8	38,7	47,3
Medicago arboreum												100	42,0	43,9
Vigna unguiculeta													100	42,9
Glycine max														100

На отриманій дендрограмі (рис. 3) чітко візуалізуються дві основні клади із високою статистичною підтримкою. Перша клада об'єднує разом із клонами двох видів чини – L. tuberosus та L. venetus – ще й послідовності обох видів гороху – P. sativum та P. fulvum. Друга містить клони двох інших видів роду Lathyrus – L. niger та L. subalpinus.



**Рис. 3.** Філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Lathyrus* методом максимальної правдоподібності (maximum likelihood) із використанням GTR моделі заміщення. Цифри біля вузлів відповідають бутстреппідтримці, розрахованій у відсотках для 1000 реплікацій

Такий результат несподіваний одразу з двох причин: по-перше, представники двох різних родів – *Lathyrus* та *Pisum* виглядають більш спорідненими, ніж частина видів роду *Lathyrus* між собою. По-друге, розподіл видів чини за кладами не відповідає актуальній таксономії роду, адже *L. venetus* разом із *L. subalpinus* та *L. niger* належать до секції *Orobus*, натомість *L. tuberosus* – представник секції *Lathyrus*. Проте, сучасна класифікація триби Fabeae та роду

Lathyrus грунтується переважно на використанні морфологічних ознак (Leht, 2009) та незначної кількості молекулярних маркерів (Asmussen, Liston, 1998; Kenicer et al., 2005; Schaefer et al., 2012; Moghaddam, Kazempour-Osaloo, 2020;). У ЦИХ дослідженнях використовували або ділянки хлоропластної ДНК, або внутрішні транскрибовані спейсери (ITS) 45S рДНК. Наразі відомо, що хлоропластних маркерів через особливості ïχ застосування успадкування часто призводить до хибних висновків. Ядерна ж ділянка ITS, незважаючи на зручність її використання, часто недостатньо поліморфна у споріднених таксонів. Ці причини можуть призводити до невисокої підтримки відповідних вузлів на дендрограмах у наявних філогенетичних роботах (Kenicer et al., 2005; Schaefer et al., 2012; Moghaddam, Kazempour-Osaloo, 2020).

Висока статистична підтримка двох основних клад на отриманій нами дендрограмі дає змогу сподіватися, що використання IGS 5S рДНК, як молекулярного маркера, для філогенетичних досліджень триби Fabeae допоможе удосконалити наявну систематику цієї групи. Зокрема, ми вважаємо, що уточнення потребує таксономічний статус роду *Pisum*, який правильніше вважати однією з внутрішньородових груп у межах роду *Lathyrus*.

## ВИСНОВКИ

Отже, дослідження організації 5S рДНК чотирьох представників роду *Lathyrus* флори України показало, що ділянка IGS цих видів відносно коротка та має низький вміст GC-пар.

рівень мінливості IGS Високий 5S рДНК да€ ЗМОГУ порівняння використовувати цієї ділянки ДЛЯ уточнення філогенетичних відносин між видами в межах триби Fabeae. IGS представників більш Водночас віддалених таксонів демонструють гомологію лише у ділянках, у яких розміщені потенційні зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III.

Порівняльний аналіз IGS 5S рДНК та побудова відповідної МL-дендрограми свідчать про доцільність трактування роду *Pisum* як внутрішньородової групи у складі роду *Lathyrus*.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 1. Бурляева МО, Вишнякова МА. (2010) Фенотипическое и генотипическое разнообразие *Lathyrus sativus* L. из коллекции ВИР. *Вестн. ВОГиС.* **14**(4): 747-760.
- 2. Крицька Л. (2014) Рід *Lathyrus* (Fabaceae) у флорі України. Український ботанічний журнал. **71**(6): 676-689.
- 3. Панчук II, Волков РА. (2007) Практикум з молекулярної генетики. *Чернівці: Рута.* 120.
- 4. Червона книга України. (2009) Рослинний світ. За ред. Дідуха ЯП. К. Глобалконсалтинг.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- Asmussen C, Liston A. (1998) Chloroplast DNA characters, phylogeny, and classification of *Lathyrus* species (Fabaceae). *Am J Bot.* 85(3): 387.
- Chalup L, Grabiele M, Neffa VS, Seijo G. (2014) DNA content in South American endemic species of *Lathyrus*. J Plant Res. 127(4): 469-480.
- Cloix C, Tutois S, Mathieu O, Cuvillier C, Espagno MC, Picard C, Tourmente S. (2000) Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genome Res.* 10(5): 679-690.
- 9. Cloix C, Yukawa Y, Tutois S, Sugiura M, Tourmente S. (2003) *In vitro* analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant J.* **35**(2): 251-261.
- 10. Coen ES, Thoday JM, Dover G. (1982) Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature*. **295**(5850): 564-568.
- 11.DNASTAR. (1998) MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.

- 12. Douet J, Tourmente S. (2007) Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*. **99**: 5-13.
- 13. Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**(5): 1792-1797.
- 14. Fulnecek J, Lim KY, Leitch AR, Kovarík A, MatyásekR. (2002) Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity* (*Edinb.*). 88(1): 19-25.
- 15. Ishchenko OO, Panchuk II. (2018) Molecular organization of 5S rDNA of perennial ryegrass *Lolium perenne* L. *Bull Vavilov Soc Genet Breed Ukraine*. 16(2): 166-173.
- 16.Kenicer GJ, Kajita T, Pennington RT, Murata J. (2005) Systematics and biogeography of *Lathyrus* (Leguminosae) based on internal transcribed spacer and cpDNA sequence data. *Am J Bot.* **92**(7): 1199-1209.
- 17. Leht M. (2009) Phylogeny of Old World *Lathyrus* L.(Fabaceae) based on morphological data. *Feddes Repertorium*. **120**(1-2): 59-74.
- 18. Linnaeus C. (1753) Genera Orobus, Lathyrus. Species Plantarum. Holmiae. 728-734.
- 19. Moghaddam M, Kazempour-Osaloo S. (2020) Extensive survey of the ycf 4 plastid gene throughout the IRLC legumes: Robust evidence of its locus and lineage specific accelerated rate of evolution, pseudogenization and gene loss in the tribe Fabeae. *PloS One.* **15**(3): e0229846.
- 20. Orioli A, Pascali C, Pagano A, Teichmann M, Dieci G. (2012) RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene*. **493**(2): 185-194.
- 21. Robledillo LÁ, Neumann P, Koblížková A, Novák P, Vrbová I, Macas J. (2020) Extraordinary Sequence Diversity and Promiscuity of Centromeric Satellites in the Legume Tribe Fabeae. *Mol Biol Evol.* 37(8): 2341-2356.
- 22. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. (1989) Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

- 23. Schaefer H, Hechenleitner P, Santos-Guerra A, de Sequeira MM, Pennington RT, Kenicer G, Carine MA. (2012) Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages. *BMC Evolutionary Biology*. **12**(1): 250.
- 24. Shelyfist AY, Tynkevich YO, Volkov RA. (2018) Molecular organization of 5S rDNA of *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *Bull Vavilov Soc Genet Breed Ukraine*. **16**(1): 61-68.
- 25. Simeone MC, Cardoni S, Piredda R, Imperatori F, Avishai M, Grimm GW, Denk T. (2018) Comparative systematics and phylogeography of *Quercus* section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation. *Peer. J.* **6**: 5793.
- 26. Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ et al. (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*. **9**(1): 4-18.
- 27. Tynkevich YO, Nevelska AO, Chorney II, Volkov RA. (2015) Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *Bull Vavilov Soc Genet Breed Ukraine*. 13(1): 81-87.
- 28. Tynkevich YO, Volkov RA. (2014) Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* **48**(1): 1-6.
- 29. Tynkevich YO, Volkov RA. (2019) 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol. Genet.* **53**(6): 459-466.
- 30. Volkov RA, Zanke C, Panchuk II, Hembleben V. (2001) Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 103(8): 1273-1282.

## 5S РИБОСОМНА ДНК ВІДДАЛЕНИХ ВИДІВ РОДУ *QUERCUS*: МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ТАКСОНОМІЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ

#### Ю.О. Тинкевич, К.Д. Бушила, Р.А. Волков

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Рід Quercus (дуб) поширений та економічно важливий рід деревних рослин. Внутрішньородова таксономія дубів досі дискусійна внаслідок поширення міжвидової гібридизації та конвергентної подібності морфологічних ознак. Враховуючи, що порівняння 5S рДНК з успіхом використовується у молекулярній таксономії рослин, ми клонували та сиквенували цю ділянку геному для представників п'яти видів трьох філогенетично віддалених секцій роду Quercus: Q. acutissima (секція Cerris) i Q. glauca (сек. Cyclobalanopsis) зі Східної Азії та Q. texana, Q. coccinea i Q. imbricaria (сек. Lobatae) з Північної Америки. Також нами ідентифіковані послідовності 5S рДНК у повногеномних сиквенсах, з бази даних Genbank для північноамериканського виду Q. lobata (cek. Quercus) та спорідненого роду Castanea. Встановлено, що в геномі дубів повторювані одиниці 55 рДНК гомогенні. Нуклеотидні заміни, які в процесі еволюції виникли у кодувальній ділянці 5S рДНК, мають компенсаторний характер і не порушують 5S pPHK. Потенційні вторинну структуру зовнішні елементи 5S рДНК відрізняються від таких у інших родин промотора дводольних рослин. Результати порівняльного аналізу послідовностей міжгенної спейсерної ділянки 5S рДНК доповнюють існуючу таксономію роду та вказують на те, що секція Cyclobalanopsis може розглядатися як окремий підрід.

#### ВСТУП

Рід Дуб (Quercus), який нараховує 400-500 видів, - найбільший у родині Fagaceae та один із економічно найважливіших родів деревних рослин. Деякі види роду мають важливе значення, як лісоутворювальні породи, особливо у помірних широтах, та полідомінантних тропічних і субтропічних лісів компоненти (Меницкий, 1984; Govaerts, Frodin, 1998; Nixon, 2006; Deng et al., 2018). Географічний ареал роду, хоча і обмежений переважно Північною півкулею, - один із найширших для деревних рослин (Nixon, 2006; Denk, Grimm, 2010; Simeone et al., 2016). Чотири з п'яти основних таксономічних груп дубів поширені у Старому світі. У Східній та південно-східній Азії зустрічається найбільша група Cyclobalanopsis, а також Quercus, Cerris та Ilex. Останні три групи також широко представлені у Західній Євразії та частині Північної Африки (Denk et al., 2017). Група Quercus має найширше розповсюдження серед усіх дубів та представлена також багатьма видами у Північній Америці, де для них використовують тривіальну назву Білі дуби. Тут більша частина її ареалу перекривається з ареалом великої ендемічної для американського континенту групи Lobatae, або Червоних дубів (Denk et al., 2017).

Нині у внутрішньородовій філогенії дубів залишається багато відкритих питань. Основні причини цього – конвергентна подібність морфологічних ознак, перекриття географічних ареалів філогенетично віддалених груп і надзвичайно поширена в межах роду міжвидова гібридизація (Van Valen, 1976; Grant, 1981; Rushton, 1993). Протягом останніх 10 років основні успіхи в філогенетичних дослідженнях роду *Quercus* пов'язані з використанням різних молекулярних маркерів ядерної або хлоропластної локалізації (Deng et al., 2018; Denk, Grimm, 2010; Simeone et al., 2016; Hubert et al., 2014; Pham et al., 2017; McVay et al., 2017; Simeone et al., 2018). У цих роботах переважно проаналізовано філогенію однієї або кількох споріднених груп роду. Незважаючи на це, отримані дані дозволили запропонувати оновлену систему роду *Quercus* (Denk et al., 2017), відповідно до якої рід поділяють на два підроди: Quercus та Cerris. До підроду *Quercus* автори відносять п'ять секцій, найбільші з яких – Quercus та Lobatae. Підрід Cerris об'єднує секції Cyclobalanopsis, Cerris та Illex. На користь такого поділу свідчать і результати дослідження i3 застосуванням геномного останнього RADсиквенування для представників усіх груп роду (Нірр et al., 2019). Трактування секцій Cerris та Illex, а також Quercus та Lobatae як сестринських груп майже не викликає сумнівів та підтверджується більшістю доступних молекулярних даних (Denk, Grimm, 2010; Hubert et al., 2014; Нірр et al., 2019). Натомість, положення групи Cyclobalanopsis не настільки однозначне. Деякі автори трактують її як окремий підрід у межах роду Quercus (Nixon, 2006; Barrón et al., 2017), або навіть як окремий споріднений рід (Chengjiu et al., 1999). У роботі Hubert та ін. положення цієї групи значно змінювалося залежно від набору використаних даних та вибору зовнішньої групи (Hubert et al., 2014).

Нірр зі співавторами звертають увагу на те, що філогенетичні дерева, отримані на основі аналізу якоїсь однієї ділянки геному, можуть суттєво відрізнятися від отриманих на основі іншої ділянки (Нірр et al., 2019). Зокрема, застосування хлоропластної ДНК виявилося неефективним для вирішення питань філогенії у роді *Quercus*, оскільки отримані результати не відповідають отриманим для ділянок ядерного геному (Denk, Grimm, 2010; Hubert et al., 2014; Pham et al. 2017). Основні причини цієї невідповідності – міжвидова гібридизація та сітчаста (ретикулярна) еволюція. Ці фактори відіграють важливу роль у еволюції роду *Quercus* (Grant, 1981; Soltis, Soltis, 2009; Simeone et al., 2018).

Тому, актуальним видається пошук додаткових ділянок ядерного геному, які можна використати для філогенетичного аналізу. Зокрема, корисний інструмент для досягнення цієї мети – послідовність міжгенного спейсера (intergenic spacer, IGS) у складі

83

5S рДНК (Volkov et al., 2004). У рослин на гаплоїдний набір хромосом може припадати один або кілька локусів 5S рДНК. Кожен із цих локусів містить від кількох сотень до тисяч тандемно повторюваних які організованих одиниць, складаються 3 еволюційно ділянки, 5S pPHK консервативної ЩО кодує та мінливого IGS (Barciszewska et al., 2001; Cloix, Tutois, 2000; Fulnecek et al., 2002; Volkov et al., 2004; Garcia et al., 2010; Navrotska et al., 2018; Ibiapino et al., 2019; Paštová et al., 2019). Завдяки універсальній для більшості рослин структурній організації та поліморфізму, IGS високому € зручним молекулярним інструментом для вивчення закономірностей еволюції та з'ясування філогенетичних відносин таксонів низького рангу (Volkov et al., 2001; Saini, Jawali, 2009; Mlinarec et al., 2016; Bolsheva et al., 2017). Ефективність використання цієї ділянки V філогенетичних дослідженнях раніше була показана для родів Solanum L. (Volkov et al., 2001), Vigna Savi (Saini, Jawali, 2009), триби Helieae (Calió et al., 2017) та деяких інших груп Magnoliophyta. IGS 5S рДНК був також успішно використаний у дослідженнях роду Quercus, проте лише для західноєвразійських представників груп Quercus, Cerris та Illex (Denk, Grimm, 2010; Simeone et al., 2018). Організація цієї ділянки геному у представників інших секцій роду поки що невідома.

В цій роботі ми аналізуємо молекулярну організацію IGS 5S рДНК *Q. coccinea* Muenchh. (sect. *Lobatae*) та порівнюємо його з раніше описаними нами послідовностями IGS п'яти видів роду *Quercus: Q. acutissima* Carruth. (sect. *Cerris*), *Q. glauca* Thunb. (sect. *Cyclobalanopsis*), *Q. lobata* Née (sect. *Quercus*), *Q. texana* Buckley, *Q. imbricaria* Michx. (sect. *Lobatae*) (Tynkevich, Volkov, 2019; Стратійчук та ін., 2019). Також для побудови філодендрограм ми використовуємо кілька послідовностей IGS для представників інших груп дубів, наявних у базі даних GenBank.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження були зразки листя видів роду *Quercus* з дендрарію Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України. Загальну ДНК ізолювали згідно зі стандартною методикою (Porebski et al.,1997; Панчук, Волков, 2007).

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували за допомогою ПЛР, використовуючи праймери 5S-L і 5S-R, які мають послідовність, комплементарну до кодувальної ділянки: 5'-GCG AGA GTA GTA CTA GGA TGC GTG AC-3' та 5'-GCT TAA CTT CGG AGT TCT GAT GGG A -3', відповідно. Застосування цих праймерів забезпечує ампліфікацію повного міжгенного спейсера та фланкувальних ділянок кодувальної послідовності 5S рДНК у видів, які належать до таксономічно віддалених родин Покритонасінних (Tynkevich, Volkov, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Volkov et al., 2017; Шелифіст та ін., 2018; Панчук та ін., 2019).

Реакційна суміш для ПЛР загальним об'ємом 20 мкл містила такі компоненти: 10 нг ДНК, 10 мкл полімеразної суміші FIREPol 5× Green та 0,5 мкМ кожного з двох праймерів. ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора BioRad T100 (BioRad, CША) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази та денатурація ДНК – 95 °С, 12 хв; (2) денатурація ДНК – 95 °С, 20 с; (3) гібридизація праймерів – 61 °С, 30 с; (4) синтез ДНК – 72 °С, 30 с; (5) завершення ампліфікації – 72 °С, 7 хв; припинення реакції – 4 °С; загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Отриманий ПЛРпродукт лігували у плазмідний вектор pJET 1.2, використовуючи набір реактивів CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США) згідно з інструкціями виробника. Далі вектор зі вставкою трансформували лінії клітини *E. coli* XL1-blue В методом електропорації, використовуючи прилад E. coli Pulsher (BioRad, рекомбінатною США). плазмідою Колонії 3 виявляли за резистентністю до ампіциліну.

Наявність вставки у плазмідах підтверджували методом ПЛРампліфікації із праймерами pJET1.2 Forward та pJET1.2 Reverse, які гібридизуються з векторною ДНК з обох боків від полілінкеру. Рекомбінантні плазміди виділяли методом лужного лізису (Sambrook et al., 1989). Отримані клони сиквеновані на фірмі LGC Genomics (Німеччина).

Полінуклеотидні послідовності аналізували за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакета програм DNASTAR. Пошук гомологічних послідовностей для порівняння проводили у базі даних Genbank, використовуючи програму BLAST (Altschul et. al, 1997). Моделі вторинних структур 5S рРНК будували з використанням програми RNAstructure (Turner, Mathews, 2009). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей виконували методом Clustal W (Thompson et al., 1994). Філогенетичну дендрограму будували за допомогою плагіна RAxML (Stamatakis, 2014) у середовищі програми Geneious Prime 2019.0.4.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Електрофоретичний аналіз показав, що після ПЛР-ампліфікації для кожного з використаних зразків ДНК утворюється лише один продукт, довжина якого для досліджених видів коливалася в межах від 340 до 450 нп. Це свідчить, що повтори 5S рДНК кожного з досліджених представників роду *Quercus* однорідні за довжиною в межах геному. В деяких зразках утворювалися кілька ПЛР-продуктів із довжинами, кратними за довжиною найкоротшому. Так, для *Q. imbricaria* розмір отриманих продуктів становив приблизно 320, 640 та 960 нп, що свідчить про ампліфікацію, відповідно, одного, двох або трьох сусідніх повторів 5S рДНК (рис. 1).

Після клонування ПЛР-продуктів у плазмідний вектор відібрано по 5-6 позитивних клонів для кожного виду. ПЛРампліфікація з використанням плазмідної ДНК та пари праймерів 5S-L + 5S-R показала, що всі відібрані клони для одного виду мають довжину вставки, яка відповідає довжині ПЛР-продукту, використаного при клонуванні. По 1-2 клони для кожного виду сиквеновано. Аналіз отриманих результатів встановив, що всі клони містять послідовності IGS 5S рДНК, які з обох боків фланковані кодувальної ділянки, фрагментами a також послідовностями використаних для ПЛР праймерів. Лише для *О. imbricaria* вставка рекомбінантної плазміди просиквенованої містить «димер» 5S рДНК, тобто складається з таких ділянок: фрагмент кодувальної ділянки 5S рРНК, перша копія IGS, повна кодувальна ділянка та друга копія IGS. На загал встановлено, що довжина повної послідовності IGS у представників роду Quercus знаходиться в межах від 217 нп до 330 нп, натомість кодувальна ділянка має типову для рослин довжину 120 нп (Barciszewska et al., 2001; Wicke et al., 2011).



**Рис. 1**. Електрофоретичне розділення ПЛР-продуктів 5S рДНК *Quercus imbricaria* (Стратійчук та ін., 2019); GR – ДНК-маркер, 100 bp GeneRuler

Порівняння отриманої нами послідовності кодувальної ділянки типовими транскриптами 5S pPHK *O. imbricaria* i3 5S pPHK модельного виду Arabidopsis thaliana, наявними у Genbank (Acc. No виявило різницю у п'ять AJ307348.2), нуклеотидних замін. Враховуючи, що 5S рРНК є високо консервативною, ми вирішили перевірити, чи отримана нами послідовність кодувальної ділянки 5S pPHK *Q. imbricaria* не являє собою псевдоген. З цією метою були розраховані та порівняні прогнозовані вторинні структури (Turner, Mathews, 2009) 5S pPHK Q. imbricaria Ta A. thaliana (Cloix et al.

2002; Douet, Tourmente, 2007; Simon et al., 2018). Аналіз цих вторинних структур (рис. 2) показав наявність усіх типових елементів (Barciszewska et al., 2001) та їх високу подібність в обох видів. Тобто, можна вважати, що розшифрована нами ділянка кодує функціонально активну 5S рРНК *Q. imbricaria*. Відсутність впливу знайдених у кодувальній ділянці нуклеотидних замін на гіпотетичну вторинну структуру 5S рРНК *Q. imbricaria* вказує на їх компенсаторний характер.



**Рис. 2**. Прогнозовані вторинні структури 5S рРНК *Arabidopsis thaliana* (А) та *Quercus imbricaria* (В). Показано 5 нуклеотидних позицій, які відрізняють послідовності рРНК обох видів (Стратійчук та ін., 2019)

Для порівняння зі сиквенованими нами зразками використано послідовності IGS представників роду *Quercus*, доступні в базі даних Genbank. Було відібрано 10 послідовностей (табл. 1), які належать євразійським видам секцій *Cerris*, *Ilex* (підрід *Cerris*) та *Quercus* (підрід *Quercus*) (Denk, Grimm, 2010; Simeone et al., 2018). Також ми ідентифікували послідовності IGS 5S рДНК у геномах

північноамериканського виду *Q. lobata* (сек. *Quercus*) (Sork et al., 2016) та представника одного з найбільш споріднених з дубами роду *Castanea – C. mollissima*.

Аналіз нуклеотидних послідовностей показав, що найбільші розміри IGS серед досліджених нами видів властиві 5S рДНК *Q. glauca*, а найменші – *Q. texana* (табл. 1). Порівняння наших даних із результатами інших авторів (Denk, Grimm, 2010; Simeone et al., 2018) свідчить, що довжина IGS у досліджених нами видів типова для представників роду *Quercus*. Вміст GC-пар в IGS коливається від 46,08 % для *Q. imbricaria* до 53,5-53,8 % для *Q. acutissima* та є значно вищим, ніж у представників інших родин дводольних рослин (Tynkevich, Volkov, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Русак та ін., 2016; Шелифіст та ін., 2018).

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей показало, що, із консенсусною послідовністю, IGS порівняно 5S рДНК досліджених видів містять нуклеотидні заміни та інсерції/делеції різної довжини (рис. 3, 4). Повністю (індели) ідентичними виявилися лише послідовності IGS двох клонів *О. соссіпеа* (рис. 3). Розмір більшості делецій не перевищує чотирьох нуклеотидів, за 10-нуклеотидної делеції в IGS *Q. glauca* та 96-ВИНЯТКОМ нуклеотидної – у *Q. texana*. Саме наявність довгої делеції у Q. texana є причиною значно менших розмірів IGS цього виду порівняно з іншими представниками роду.

На 3'-кінці IGS виявлені потенційні зовнішні елементи промотора PHK-полімерази III, зокрема AT-збагачена ділянка (так званий TATA-box), раніше описана для *Arabidopsis thaliana* (Douet, Tourmente, 2007; Simon et al., 2018; De Souza et al., 2012). У цього виду та у *Rosa rugosa* (Tynkevich, Volkov, 2014) ця ділянка має довжину 8 нп та починається у позиції -30. У дубів вона має вигляд TTTATAA та знаходиться у тій самій позиції, водночас у інших рослин TATA-box може дещо відрізнятися за довжиною та розташуванням (Тинкевич та ін., 2015; Русак та ін., 2016; Volkov et al., 2017; Ishchenko et al., 2018; Шелифіст та ін., 2018). Таблиця 1 (початок). Характеристика IGS 5S рДНК видів роду Quercus

Вид		Клон / фр	агмент ДНК	IC	S	
Назва	Поширення	Назва	GenBank Acc. No	Довжина, нп	Вміст GC-пар, %	Посилання
Q. coccinea	ENA	Qucoc1	1	217	47,0	Ця стаття
Muenchh.		Qucoc5	ı	217	47,0	
Q. acutissima	EA	Quacu4	MN124988	316	53,8	Tynkevich, Volkov
Carruth.		Quacu5	MN124989	316	53,48	2019
Q. glauca Thunb.	EA	Qugla4	MN124990	330	51,82	
		Qugla5	MN124991	328	52,44	
Q. texana Buckley	ENA	Qutex4	MN124992	217	47,93	
		Qutex6	MN124993	217	47,0	
Q. lobata Née	WNA	Qulob (SW786 ch. 5, 33816993- 33817322 bp)	LRBV 02000005.1	219	50,68	Sork et al. 2016; Tynkevich, Volkov 2019
Q. <i>imbricaria</i> Michx.	ENA	Quimb1		217	46,08	Стратійчук та ін., 2019
Q. baloot Griffith	HC	ba01as1	FM243449.1	315	53,33	Denk et al., 2010
Q. cerris L.	WE	ce1502I	LT971465.1	319	52,98	Simeone et al., 2018
Q. coccifera L.	WE	co06s01	FM243538.1	316	54,75	Denk et al., 2010

Таблиця 1 (закінчення). Характеристика IGS 5S рДНК видів роду Quercus

B	Ти	Клон / фр	агмент ДНК	IC	S	
Назва	Поширення	Назва	GenBank Acc. No	Довжина, нп	Вміст GC- пар, %	Посилання
Q. floribunda Lindl. ex A.Camus	HC	di01s02	FM243452.1	319	54,55	Denk et al., 2010
Q. ilex L.	WE	ix83s04	FM243809.1	316	54,43	Denk et al., 2010
Q. infectoria Oliv.	WE	bo02s03	FM243118.1	230	52,61	Denk et al., 2010
Q. lusitanica Lam.	WE	lu01s03	FM243204.1	230	52,17	Denk et al., 2010
Q. macrolepis Kotschy	WE	ml0304I	LT971697.1	318	54,72	Simeone et al., 2018
Q. robur L.	WE	ro14s05	FM243373.1	230	52,17	Denk et al., 2010
Q. suber L.	WE	su4704I	LT971912.1	306	52,94	Simeone et al., 2018
<i>Castanea</i> <i>mollissima</i> Blume	EA	Camol (contig 21694, 70644 - 71013 bp)	JRKL01129996.1	245	45,31	Cannon et al., unpublished, Tynkevich, Volkov 2019
					;	. (

*Скорочення*: ГК – гімалайський коридор, ЗЄ –Західна Євразія, ЗПА – західна Північна Америка, СА – Східна Азія, СПА – східна Північна Америка

Інший важливий для ініціації транскрипції сигнал – динуклеотид GC (Douet, Tourmente, 2007) – у представників роду *Quercus* дуплікований і перебуває, як у типовій позиції -12, так і додатково у позиції -14. Цікаво, що найконсервативніший у покритонасінних рослин зовнішній елемент промотора – цитозин у позиції -1 (Douet, Tourmente, 2007; Simon et al., 2018; Tynkevich, Volkov, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Русак та ін., 2016) – у IGS дубів замінений на тимін. Отримані дані свідчать, що зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III у роді *Quercus* та в інших груп дводольних рослин значно відрізняються.

Особливістю будови 5S рДНК дубів є наявність двох копій тандемних субповторів завдовжки близько 70 нп у IGS всіх досліджених видів, крім *Q. lobata* та інших представників секції Quercus (рис. 1). Обидві копії субповторів починаються оліго-dT різняться кількома мутаціями. послідовністю Оліго-dT та послідовність у складі першого субповтору перебуває на початку IGS безпосередньо після кодувальної ділянки і ймовірно виконує функцію термінатора транскрипції, як це доведено для Arabidopsis thaliana (Cloix et al., 2002; Douet, Tourmente, 2007; Layat et al., 2012; Simon et al., 2018). Наявність аналогічної ділянки показана і для ряду інших покритонасінних рослин (Garcia et al., 2010; Tynkevich, Volkov, 2014; Volkov, Panchuk, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Русак та ін., 2016; Tamayo-Ordóñez et al., 2018; Панчук та ін., 2019). Можна припустити, що оліго-dT послідовність у складі другого субповтору може мати функцію «резервного» термінатора транскрипції.

На основі вирівнювання нуклеотидних послідовностей вирахуваний рівень подібності між IGS 5S рДНК дубів (табл. 2). Значення цього показника між клонами одного виду – в межах від 97,9 % для *Q. glauca* до 99,7 % для *Q. acutissima*. Отже, для видів роду *Quercus* характерна висока внутрішньогеномна подібність повторів 5S рДНК як за довжиною, так і за послідовністю нуклеотидів.

92

			5S rDNA repeats	s ======		
- "Pr1-			IGS		5S rRNA	>
					← Pr2	
	i					
						2 2 2
		10	20	30	40	50
Consensus	TTTCTT	TXCTTCG	GA		XTTTTTTT	- <i>GCT</i> G
Ouacu4	-C	.TG	C		TC.CTT	C.TC.
Quacu5	-c	.TG	C		ТСТТ	C.TC.
Qugla4	T	.TTG.	AAATTTTTT	TTTTTTTTTT	TTG	Γ.TG.
Qugla5	T	.TTG.	AAATTTTTT	TTTTTTTTT	ΤΤΤ	r.tt.
Qulob	тс	TC	··		т	
Qutex4		GC	.G		A	CT.
Qutex6		GC			A	CT.
Qucoc1		GC	••		A	CT.
Qucoc5		GC	••		A	CT.
Quimb1		GC	•••		AC	CT.
	0	60	7	80	90	100
Consensus Quacu4 Quacu5 Qugla4 Qugla5 Qulob Qutex4 Qutex6 Qucoc1 Qucoc5 Quimb1	GGCTTAT		GGCGGTCCAGO G. G. G. G. G.	CACGCTCGC		2ACCC
		110	120	130 +	140	150 +
Consensus Quacu4 Quacu5 Qugla4 Qugla5 Qulob Qutex4 Qutex6 Qucoc1	CT <u>TTCT</u> .GC .GC	<u>FTTTCTTC</u> G G G	CCATTTTTTT CC.C CC.C	<u>rGC-TGGGC-1</u> .T.G.CGG. .T.G.CGG. AC AC	<u>TGTCGTTTAC</u>	<u>STCGX</u> G .CG .CG T T
Qucoc5	• • • • • •				G	Т Т

**Рис. 3** (*початок*). Структурна організація IGS 5S рДНК видів роду *Quercus*. Pr1 та Pr2 – праймери 5S-L та 5S-R, відповідно. Виділено потенційні зовнішні елементи промотора; жирним курсивом вказано оліго-dT послідовність термінатора; стрілками позначено розташування субповторів у IGS. Характеристики використаних для вирівнювання клонів подано у табл. 1

	160	170	180	190	200
Consensus Quacu4 Quacu5 Qugla4 Qugla5 Qulob Qutex4 Qutex6 Qucoc1 Qucoc5 Quimb1	TCCAXCACGCTCGC        G        GA.G        A        A        A        A        A        A        A        A        A        A        A        A        A        A        A        A        A        A        A	TTTGXAGGCT T.GGCTTC C.GGCTTC C.GGCTCC C.GGCTCC C.GGCTCC A A A A A A A A		AGGC-A-AAA AGGCGAAAAAA AGGCCGAAAAAA AGGCCAGAAAA AGGCCAGAAAA AGGCCAGAAAA	250
Consensus Quacu4 Quacu5 Qugla4 Qugla5 Qulob Qutex4 Qutex6 Qucoc1 Qucoc5 Quimb1	GATCTCGT GCCGCTGATCTCGT GCCGCTGATCTCGT GATCTCGT GCCGCTGATCTCGT GCCGCTGATCTCGT 	TTTTGGG-GCT-A TTTTGGGCGCTAA TTTTGGGCGCTAA TTTTGGGTGCTGA TTTTGGGTGCTGA TTTTGGGTGCTAA	ATTGCGC AGCGTCAC	GCG GCGACGTCGAA GCGACGTCGAA GCGATCTTGAA GCGATCTTCGAA GCGGCG	-ATC- AATCC AATCC AATCC AATCC AATCC -ATCT 
2.0.2.0.0.2	260	270	280	290	300
Consensus Quacu4 Quacu5 Qugla4 Qugla5 Qulob Qutex4 Qutex6 Qucoc1 Qucoc5 Quimb1	-CGACCC-TC GCGGAAGCCCC-TC GCGGAAGCCCC-TC GCGGGAGGCCCGTC GCGGGAGGCCCCTC -CGAAATGCCC-TC	GGGTGCACC GGG-T GGGG-T GGGGGT GGGGGT GGGG-CG GGGG-CG	CTCTGGTGT CC CC CC CC	IXAAGTGCAT( .AA .AA GA( GA( .G .G .G .G .G	CGCXG TT. G.T. G.T. G.T. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C.
	310	320	330	340	
Consensus Quacu4 Qugla4 Qugla5 Qulob Qutex4 Qutex6 Qucoc1 Qucoc5 Quimb1	CATTCGGATCC-TT .G.AA .G.AA 	TATAAGGATTTA	AACGCGCTTA	IGCTGAT	
	"TAT	ra"-box	GC		

**Рис. 3** (закінчення). Структурна організація IGS 5S рДНК видів роду Quercus



**Рис. 4.** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК видів роду *Quercus* та *Castanea mollissima*. Характеристики використаних для порівняння клонів подано у табл. 1. Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: — – менше 60 %, — – 60-80 %, — – 80-100 %, — – 100 %

Раніше у різних видів рослин виявлені у геномі як один, так і кілька варіантів 5S рДНК, які можуть значно відрізнятися (Tynkevich, Volkov, 2014; Volkov et al., 2017; Ishchenko et al., 2018). Висловлено думку, що різні варіанти 5S рДНК мають різну хромосомну локалізацію, що забезпечує їхню незалежну еволюцію, натомість у межах одного локусу завдяки генній конверсії підтримується висока подібність окремих повторів (Ishchenko et al., 2018). Наші нові результати підтримують таку думку, адже у каріотипі дубів наявний лише один локус 5S рДНК на другій хромосомі (Ribeiro et al., 2011).

95

Таблиця 2. Рівень подібності (%) IGS 5S рДНКвидів роду Quercus

Вид / клон	Quacu-4	Quacu-5	Q. cerris	Q. suber	Q. ilex	Q. baloot	Qugla-4	Qugla-5	Q. robur	Q. lobata	Qutex-4	Qutex-6	Qucoc-1,5	Quimb-1	C. mollissima
Quacu-4	100	99,7	91,5	86,8	84,4	87,8	70,5	71,2	60,5	58,3	57,3	57,3	57,0	56,0	55,9
Quacu-5		100	91,8	87,1	84,7	88,1	70,8	71,5	60,5	58,3	57,6	57,6	57,3	56,3	55,9
Q. cerris			100	92,8	82,2	86,9	70,4	71,1	61,5	58,7	56,1	56,4	56,7	55,8	55,4
Q. suber				100	82,8	85,8	68,6	69,3	60,4	57,6	58,2	58,8	59,2	58,2	53,6
Q. ilex					100	87,5	69,9	70,0	62,3	61,1	56,0	56,6	57,0	55,4	55,9
Q. baloot						100	74,4	74,6	61,9	60,7	60,0	60,6	61,0	59,4	57,3
Qugla-4							100	97,9	50,6	49,4	54,7	55,3	55,6	53,8	47,6
Qugla-5								100	51,2	50,0	55,4	56,0	56,3	54,4	48,1
Q. robur									100	90,1	40,4	40,7	40,7	39,4	62,5
Q. lobata										100	38,4	38,7	38,7	37,4	61,5
Qutex-4											100	99,1	98,6	94,5	38,4
Qutex-6												100	99,5	95,4	38,1
Qucoc-1,5													100	95,9	38,1
Quimb-1														100	37,1
C. mollissima															100

Примітка. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1

Привертає увагу відносно високий рівень подібності між східноазійськими представниками секцій *Cerris* та *llex*, а саме – 87,8 та 88,1 % між різними клонами *Q. acutissima* та *Q. baloot*. Ці значення дещо перевищують рівень подібності між IGS *Q. acutissima* та західноєвразійським представником секції *Cerris* – *Q. suber* (86,8-87,1 %) та аналогічне значення між видами секції *llex*: *Q. baloot* та західноєвразійським *Q. ilex* (87,5 %). Рівень подібності між західноєвразійськими представниками цих двох секцій помітно нижчий і становить від 82,2 до 82,8 %.

Використовуючи наявні послідовності IGS, ми побудували дендрограму, яка відображає філогенетичні відносини різних груп роду *Quercus*. Як зовнішню групу обраний представник спорідненого роду Castanea mollissima (рис. 5). Дві основні клади на отриманій дендрограмі відповідають двом підродам дубів: Cerris та Quercus. До підроду Cerris належать секції Cerris та Ilex, а до підроду Quercus секції Quercus та Lobatae, що цілком узгоджується з нещодавно запропонованою класифікацією роду (Denk et al., 2017). Проте, на відміну від наявних уявлень, східноазійська секція Cyclobalanopsis (Q. glauca) перебуває у кладі підроду Quercus замість підроду Cerris та статистичною підтримкою групується високою разом i3 3 представниками північноамериканської секції Lobatae.

Як уже згадувалося, положення секції Cyclobalanopsis – найсуперечливіше питання внутрішньородової таксономії роду Quercus. Навіть автори, які зараховують її до підроду Cerris, *Cyclobalanopsis* зазначають. ШО положення клади на філогенетичних деревах нестабільне і легко змінюється, зокрема залежно від вибору зовнішньої групи (Denk, Grimm, 2010; Hubert et al., 2014). Зважаючи на ці дані, ми вважаємо, що таксономічний статус Cyclobalanopsis потребує додаткового уточнення. Водночас, виявлена нами спорідненість груп Cyclobalanopsis та Lobatae дає по-новому глянути на ендемічної ЗМОГУ походження ДЛЯ Американського континенту секції Lobatae.

Також нами проаналізовано філогенетичне положення географічно віддалених видів у межах секцій. Встановлено, що *Q. acutissima* (сек. *Cerris*) з Південно-Східної Азії та *Q. lobata* з Північної Америки (сек. *Quercus*) виступають сестринськими таксонами щодо західноєвразійських видів цих же секцій (рис. 3). При цьому *Q. lobata* виявився набагато ближче споріднений зі своїми родичами із Західної Євразії, ніж *Q. acutissima* – зі своїми. Імовірною причиною такої різниці може бути те, що північноамериканські та західноєвразійські види сек. *Quercus* дивергували пізніше, ніж види сек. *Cerris* з Південно-Східної Азії та Західної Євразії.



Рис. 5. Філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Quercus* методом максимальної правдоподібності з використанням GTR моделі заміщення. Цифри біля гілок відповідають бутстреп-підтримці, розрахованій у відсотках для 1000 реплікацій

## ВИСНОВКИ

Отже, у геномах видів роду *Quercus* наявний лише один варіант повторів 5S рДНК, який характеризується високою внутрішньогеномною гомогенністю.

Заміни нуклеотидів, які протягом еволюції виникали у кодувальній ділянці 5S рДНК дубів, мають компенсаторний характер і не порушують вторинну структуру 5S рРНК.

Потенційні зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III, наявні у IGS 5S рДНК, відрізняються від таких в інших родинах дводольних рослин.

Рівень подібності IGS між видами *Quercus* варіює у широких межах, що робить цю ділянку геному зручним інструментом для реконструкції філогенії в межах роду.

Результати порівняльного аналізу IGS узгоджуються з нинішньою систематикою роду, за винятком положення секції *Cyclobalanopsis*, яке потребує додаткового уточнення.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 1. Меницкий ЮЛ. (1984) Дубы Азии. Ленинград: Наука. Ленингр. отд-ние.
- 2. Панчук II, Волков РА. (2007) Практикум з молекулярної генетики. *Чернівці: Рута*.
- 3. Панчук II, Касіянчук РМ, Волков РА. (2019) Субповтори у 5s рДНК як молекулярний маркер у популяціях Acer platanoides L. Факт. Експ. Евол. Орг. 25: 80-85.
- 4. Русак ОО, Петращук ВІ, Панчук II, Волков РА. (2016) Молекулярна організація 5S рДНК двох українських популяцій явора (Acer pseudoplatanus). Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 14(2): 216-220.
- 5. Стратійчук АС, Деревенко ТО, Тинкевич ЮО. (2019) Організація повторюваної послідовності 5S рДНК *Quercus imbricaria* Michx. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* **14**(2): 179-186.
- 6. Тинкевич ЮО, Невельська АО, Чорней II, Волков РА. (2015) Організація та мінливість міжгенного спейсера 5S рДНК *Lathyrus venetus. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* **13**(1): 81-87.
- 7. Шелифіст АЄ, Тинкевич ЮО, Волков РА. (2018) Молекулярна організація 5S рДНК *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *Bicн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* **16**(1): 61-68.

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389–3402.
- Barciszewska MZ, Szymañski M, Erdmann VA, Barciszewski J. (2001) Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim. Polon.* 48(1): 191–198.
- Barrón E, Averyanova A, Kvaček Z, Momohara A, Pigg KB, Popova S, Postigo-Mijarra JM, Tiffney BH, Utescher T, Zhou ZK. (2017) The fossil history of *Quercus*. In: *Oaks Physiological Ecology*. *Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L*. Chapter 3. *Cham: Springer*: 39–105.
- Bolsheva NL, Melnikova NV, Kirov IV et al. (2017) Evolution of blue-flowered species of genus *Linum* based on highthroughput sequencing of ribosomal RNA genes. *BMC Evol. Biol.* 17(2): 253.
- 12. Calió MF, Lepis KB, Pirani JR, Struwe L. (2017) Phylogeny of Helieae (Gentianaceae): Resolving taxonomic chaos in a Neotropical clade. *Mol. Phylogenet. Evol.* **106:** 192-208.
- Chengjiu H, Yongtian Z, Bartholomew B. (1999) Fagaceae. In: Zheng-Yi W, Raven P (eds) Flora of China. *Beijing: Science Press.* 4: 300–400.
- 14. Cloix C, Tutois S, Yukawa Y, Mathieu O, Cuvillier C, Espagnol MC, Tourmente S. (2002) Analysis of the 5S RNA pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. *Genome Res.* 12(1): 132–144.
- 15. Cloix C, Tutois S. (2000) Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genome Res.* 10: 679–690.
- 16. De Souza TB, Gaeta ML, Martins C, Vanzela ALL. (2019) IGS sequences in *Cestrum* present AT-and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol. Biol. Reports.* 47(1): 55–66.

- 17. Deng M, Jiang XL, Hipp AL, Manos PS, Hahn M. (2018) Phylogeny and biogeography of East Asian evergreen oaks (*Quercus* section *Cyclobalanopsis*; Fagaceae): insights into the Cenozoic history of evergreen broad-leaved forests in subtropical Asia. *Mol. Phylogenet. Evol.* **119**: 170-181.
- Denk T, Grimm G. (2010) The oaks of western Eurasia: Traditional classifications and evidence from two nuclear markers. *Taxon.* 59(2): 351–366.
- 19. Denk T, Grimm GW, Manos PS, Deng M, Hipp AL. (2017) An updated infrageneric classification of the oaks: review of previous taxonomic schemes and synthesis of evolutionary patterns. *In:* Gil-Pelegrín E., Peguero-Pina J., Sancho-Knapik D (eds). Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L. Tree Physiology 7. *Springer*: 13–38.
- 20. Douet J, Tourmente S. (2007) Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*. **99**: 5–13.
- 21. Fulnecek J, Lim KY, Leitch AR, Kovarık A, Matyasek R. (2002) Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity* (*Edinb.*). **88**: 19–25.
- 22. Garcia S, Panero JL, Siroky J, Kovarik A. (2010) Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *BMC Plant Biol.* **10**: 176.
- 23. Govaerts R, Frodin DG. (1998) World checklist and bibliography of Fagales: Betulaceae, Corylaceae, Fagaceae and Ticodendraceae. *London: Royal Botanic Gardens, Kew.*
- 24.Grant V. (1981) Plant speciation (2nd ed). New York: Columbia Univ. Press.
- 25. Hipp AL, Manos PS, Hahn M et al. (2019) Genomic landscape of the global oak phylogeny. *bioRxiv*: 58–72.
- 26.Hubert F, Grimm GW, Jousselin E, Berry V, Franc A, Kremer A. (2014) Multiple nuclear genes stabilize the phylogenetic backbone of the genus *Quercus*. *System. Biodivers*. **12**(4): 405-423.

- 27. Ibiapino A, García MA, Ferraz ME, Costea M, Stefanovic S, Guerra M. (2019) Allopolyploid origin and genome differentiation of the parasitic species *Cuscuta veatchii* (Convolvulaceae) revealed by genomic in situ hybridization. *Genome*. 62(7): 467-475.
- 28. Ishchenko OO, Panchuk II, Andreev IO, Kunakh VA, Volkov RA.
  (2018) Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschapmpsia antarctica*. *Cytol. Genet.* **52**(6): 416-421.
- 29. Layat E, Saez-Vasquez J, Tourmente S. (2012) Regulation of Pol Itranscribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis. Plant Cell Physiol.* **53**(2): 267-276.
- 30. McVay JD, Hauser D, Hipp AL, Manos PS. (2017) Phylogenomics reveals a complex evolutionary history of lobed-leaf white oaks in western North America. *Genome*. **60**(9): 733-742.
- 31. Mlinarec J, Franjević D, Bočkor L, Besendorfer V. (2016) Diverse evolutionary pathways shaped 5S rDNA of species of tribe Anemoneae (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **182**(1): 80-99.
- 32. Navrotska D, Andreev I, Betekhtin A et al. (2018) Assessment of the molecular cytogenetic, morphometric and biochemical parameters of *Deschampsia antarctica* from its southern range limit in maritime Antarctic. *Polish Polar Res.* **39**(4): 525-548.
- 33. Nixon KC. (2006) Global and neotropical distribution and diversity of oak (genus *Quercus*) and oak forests. In: Ecology and conservation of neotropical montane oak forests. Ecological Studies (Analysis and synthesis) *Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.* **185**: 3-13.
- 34. Paštová L, Belyayev A, Mahelka V. (2019) Molecular cytogenetic characterization of *Elytrigia* × *mucronata*, a natural hybrid of *E. intermedia* and *E. repens* (Triticeae, Poaceae). *BMC Plant Biol*. 19: 230.
- 35.Pham KK, Hipp AL, Manos PS, Cronn RC. (2017) A time and a place for everything: phylogenetic history and geography as joint predictors of oak plastome phylogeny. *Genome*. **60**(9): 720-732.
- 36. Porebski S, Bailey LG, Baum BR. (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* **15**: 8-15.

- 37. Ribeiro T, Loureiro J, Santos C, Morais-Cecílio L. (2011) Evolution of rDNA FISH patterns in the Fagaceae. *Tree Genet. Genomes.* 7: 1113-1122.
- 38. Rushton BS. (1993) Natural hybridization within the genus *Quercus* L. *Ann. Sci. For.* **50**(1): 73-90.
- 39. Saini A, Jawali N. (2009) Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* **280**(3-4): 187-206.
- 40. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. (1989) Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 41. Simeone MC, Cardoni S, Piredda R, Imperatori F, Avishai M, Grimm GW, Denk T. (2018) Comparative systematics and phylogeography of *Quercus* Section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation. *PeerJ.* 6: e5793.
- 42. Simeone MC, Grimm GW, Papini A, Vessella F, Cardoni S, Tordoni E, Piredda R, Franc A, Denk T. (2016) Plastome data reveal multiple geographic origins of *Quercus* Group Ilex. *PeerJ*. 4: e1897.
- 43. Simon L, Rabanal FA, Dubos T. et al. (2018) Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **46**(6): 3019–3033.
- 44. Soltis PS, Soltis DE. (2009) The role of hybridization in plant speciation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 561-588.
- 45. Sork VL, Squire K, Gugger PF, Steele SE, Levy ED, Eckert AJ. (2016) Landscape genomic analysis of candidate genes for climate adaptation in a California endemic oak, *Quercus lobata. Am. J. Bot.* 103(1): 33-46.
- 46. Stamatakis A. (2014) RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 30(9): 1312–1313.
- 47. Tamayo-Ordóñez YJ, Narváez-Zapata JA, Tamayo-Ordóñez MC, Sánchez-Teyer LF. (2018) Retroelements and DNA methylation could contribute to diversity of 5S rDNA in *Agave L. J. Mol. Evol.* 86(6): 404-423.

- 48. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**(22): 4673–4680.
- 49. Turner DH, Mathews DH. (2009) NNDB: The nearest neighbor parameter database for predicting stability of nucleic acid secondary structure. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue): D280-D282.
- 50. Tynkevich YO, Volkov RA. (2014) Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* **48**(1): 1-6.
- 51. Van Valen L. (1976) Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon.* **25**(2-3): 233–239.
- 52. Venkateswarlu K, Lee SW, Nazar RN. (1991) Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene*. 105(2): 249-254.
- 53. Volkov AR, Panchuk II. (2014) 5S rDNA of *Dactylus glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine.* **12**(1): 3-11.
- 54. Volkov RA, Medina FJ, Zentgraf U, Hemleben V. (2004) Molecular cell biology: organization and molecular evolution of rDNA, nucleolar dominance, and nucleolus structure. *Prog. Bot.* **65**: 106-146.
- 55. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV, Hosiawa-Baranska M, Maluszynska J, Hemleben V. (2017) Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* **17**: 21.
- 56. Volkov RA, Zanke C, Panchuk II, Hemleben V. (2001) Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 1273-1282.
- 57. Wicke S, Costa A, Munoz J, Quandt D. (2011) Restless 5S: the rearrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* **61**(2): 321-332.

# МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ МІЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА 5S рДНК ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ *GENTIANA* L.

# **І.О.** Андрєєв<sup>1</sup>, В.М. Мельник<sup>1,2</sup>, Г.Ю. Мирюта<sup>1</sup>, А.Є. Шелифіст<sup>2</sup>, Р.А. Волков<sup>2</sup>, В.А. Кунах<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України вул. Акад. Заболотного, 150, 03143 Київ, Україна

<sup>2</sup> Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

E-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

Тирлич (Gentiana) – типовий рід родини Gentianaceae, який включає близько 360 видів. Це складний у систематичному відношенні таксон, який досі не має загальновизнаної системи. Останніми десятиріччями в таксономічних дослідженнях тирличів поряд з хемо- і цитотаксономією використовують молекулярно-генетичні маркери. Залучення додаткових ДНК-маркерів, зокрема ділянки міжгенного спейсера (intergenic spacer, IGS) 5S рДНК, може покращити розуміння філогенії окремих таксонів роду Gentiana. Наразі цю ділянку вивчено лише у окремих видів роду. В цій роботі ми провели аналіз нуклеотидної послідовності IGS 5S рДНК п'ятьох видів Gentiana флори України, а також дослідили особливості її організації у представників різних секцій роду із залученням даних GenBank. У п'яти видів роду Gentiana флори України ділянка IGS представлена в геномі одним варіантом повторів і містить типові лля інших родин покритонасінних рослин мотиви, зокрема консервативний оліго-dT мотив на початку IGS, який відіграє роль ділянки термінації транскрипції, та АТ-багату ділянку, що передує кодувальному регіону. Водночас консервативний GC-елемент в ділянці ініціації транскрипції замінений на динуклеотид АС. Аналіз

15 європейських та азійських видів роду *Gentiana* показав, що IGS 5S рДНК характеризується значним міжвидовим поліморфізмом, що може бути використано для уточнення філогенетичних відносин між представниками роду. Результати порівняльного аналізу загалом узгоджуються з загальноприйнятими уявленнями про систематику роду за винятком положення виду *G. asclepiadea*, який за нашими даними споріднений з видами секції *Gentiana*.

#### вступ

Тирлич (Gentiana L.) – типовий рід родини Gentianaceae Juss., який видів (Tutin, 1972). близько 360 ∐е включає складний V систематичному відношенні таксон, чим і пояснюється відсутність загальновизнаної системи даного роду. Остаточно невирішеними залишаються питання обсягу роду Gentiana, систематичної цінності ознак, ступеня їх мінливості та таксономічного статусу окремих поліморфних видів (Pringle, 1967; Но, Liu, 1990; Но et al., 1996; Struwe et al., 2002). Останні кілька десятків років для таксономічних досліджень тирличів хемопоряд i3 i цитотаксономією використовують молекулярно-генетичні маркери (Yuan, 1993; Yuan, Küpfer, 1993; Yuan et al., 1997; Küpfer, Yuan, 1996; Hungerer, Kadereit, 1998; Jensen, Schripsema, 2002; Hammerli, 2007; Favre et al., 2010, 2014; Mel'nyk et al., 2014; Kunakh et al., 2015). Зокрема, широкого хлоропластні послідовності набули та застосування лілянки внутрішніх транскрибованих спейсерів 35S рибосомної ДНК (Gielly, Taberlet, 1994, 1996; Gielly et al., 1996; Yuan et al., 1996; Yuan, Küpfer, 1997). Проте дані таких досліджень можуть давати суперечливі результати, що зумовлено різною швидкістю еволюції різних ділянок геному. Залучення інших типів молекулярних маркерів, наприклад ділянки міжгенного спейсера (intergenic spacer, IGS) допомогти краще зрозуміти філогенію роду 5S рДНК може Gentiana. На жаль, нуклеотидну послідовність IGS 5S рДНК вивчено лише у деяких видів чотирьох секцій роду (Calathianae Froel., Ciminalis, Monopodiae i Pneumonanthe (Gled.) Gaudin) (Hammerli, 2007; Wong et al., 2013).

Мета нашої роботи – дослідження нуклеотидної послідовності міжгенного спейсера генів 5S рРНК деяких видів *Gentiana* флори України, а також вивчення особливостей організації цієї ділянки у представників роду шляхом порівняльного аналізу з іншими видами, представленими у базі даних GenBank.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження слугували рослини п'яти видів тирличів, які належать до різних секцій і відрізняються за морфологією, анатомією, умовами зростання та ін. Зразки *G. acaulis*, *G. asclepiadea, G. lutea, G. pneumonanthe* та *G. punctata* були взяті з природних місць зростання в Україні. Для порівняльного аналізу використано також послідовності IGS гена 5S pPHK інших видів роду *Gentiana*, знайдені в базі даних GenBank (табл.).

ДНК виділяли з листків за методикою з використанням ЦТАБбуфера (Rogers, Bendich, 1985).

Ділянку 5S рДНК, яка містила IGS, ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із застосуванням пари праймерів p5S1 (5'– ATG CAA GCT TGA CCT CCT GGG AAG TCC –3') і p5S2 (5'– GCA TAA GCT TGC GGA GTT CTG ATG GG –3'), специфічних до кодувальної ділянки.

Ампліфікацію проводили в термоциклері Терцик МС2 (Біотехнологія, Росія). Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ dNTP, 1,25 U Таqполімерази, 0,25 мкМ праймера,  $1^{\times}$ ПЛР-буфер з 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію проводили в наступному 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.

Отримані ПЛР-продукти розділювали за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, вирізали й очищали від агарози з використанням набору реагентів Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (MBI Fermentas, Литва). Виділені фрагменти ДНК після гідролізу ендонуклеазою рестрикції НіпdIII лігували в плазміду pUC18.
Отримані плазмідні конструкції клонували в *Е. coli*. Визначення послідовності клонованих фрагментів ДНК проводили із використанням зворотного М13-праймера на фірмі GATC-Biotech (Нідерланди).

Секція	Вил	Номер в	Довжина IGS,
		GenBank	НП
	G. bavarica	EF626753	384
	<i>G. brachyphylla</i> subsp. <i>favratii</i>	EF626760	388
Calathiana	G. nivalis	EF626783	495
Calatnianae	G. pumila	EF626764	368
	G. rostanii	EF626789	372
	G. terglouensis	EF626762	386
	G. verna subsp. pontica	EF626768	371
Ciminalia	G. acaulis	EF626794	500
Ciminalis	G. acaulis*	_	500
Contiana	G. lutea*	_	399
Gentiana	G. punctata *	_	400
* * *	G. asclepiadea*	_	408
Monopodiae	G. rigescens	GQ864058	215
	G. manshurica	GQ864048	411
Pnoumonantho	G. triflora	GQ864053	411
1 neumonunine	G. scabra	GQ864042	410
	<i>G. pneumonanthe</i> *	_	371

Таблиця. Види роду *Gentiana*, послідовності IGS 5S рДНК яких використано для порівняльного аналізу

Примітка: \* – послідовності, визначені нами (Андрєєв та ін., 2017; Мельник та ін., 2020); \*\*\* – належність *G. asclepiadea* до однієї з наведених секцій роду (*Pneumonanthe*) має суперечливий характер і не визначена остаточно

Вирівнювання отриманих послідовностей проводили із застосуванням алгоритму MUSCLE (Edgar, 2004) за допомогою вебдодатку на сервері EMBL-EBI (Madeira et al., 2019) з подальшим уточненням вручну й аналізом у програмі Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Філогенетичну дендрограму будували за допомогою програми W-IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016) методом максимальної правдоподібності з використанням GTR моделі заміщення і 1000 реплікацій для оцінки бутстреп-підтримки.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Електрофоретичне фракціонування ПЛР-продуктів ДНК показало, що в результаті реакції ампліфікації з парою праймерів p5S1 та p5S2 у *G. lutea* та *G. asclepiadea* утворюються два головні фрагменти розміром близько 300 та 550 нп та кілька фрагментів меншої інтенсивності (мінорних) розміром близько 450, 1200 та 800 нп (останній лише у *G. asclepiadea*), а у *G. acaulis* – один головний фрагмент розміром близько 600 нп та кілька мінорних фрагментів меншого розміру. У *G. pneumonanthe* та *G. punctata* в результаті ПЛР утворювалося по одному фрагменту з розміром близько 480–500 нп. Здійснено клонування і сиквенування головних ПЛР-фрагментів розміром 480–600 нп з усіх видів тирличів та 800 нп фрагмента з *G. asclepiadea* (рис. 1).

Для G. asclepiadea проаналізовано чотири клони фрагмента довжиною 550 нп, та два клони фрагмента довжиною 800 нп. За даними сиквенування чотирьох клонів ПЛР-фрагмента довжиною розмір ділянки IGS 408 нп. Як 550 нп становить показав порівняльний аналіз послідовностей клонів різного розміру, ПЛРфрагменти довжиною 800 нп утворилися внаслідок ампліфікації попереднього частину IGS ділянки, яка містила повтору, кодувальний perioн та повний IGS. Причини цього розглянуто нижче в ході аналізу результатів вирівнювання послідовностей IGS різних видів. Рівень подібності між варіантами IGS становив 98-100 %.

Аналіз клону 5S рДНК *G. lutea* показав, що розмір IGS цього виду дорівнює 402 нп. Довжина клонованої послідовності *G. punctata* становила 403 нп. Довжина двох клонів *G. pneumonanthe* виявилась ідентичною – 374 нп. Порівняння нуклеотидних послідовностей цих клонів між собою дозволило встановити відмінності на рівні 4,3 % (16 нуклеотидів). Майже половину цих варіацій (7) становили заміни  $G \rightarrow A$ , чверть із них (4) припадала на заміни  $T \rightarrow C$ .



Рис. 1. Електрофоретичне фракціонування продуктів ампліфікації повтору 5S рДНК у трьох видів тирличів (за Андрєєв та ін., 2017). A: 1 – Gentiana lutea; 2 – Gentiana asclepiadea; 3 – Gentiana acaulis; M – молекулярний маркер. Б: 4 – Gentiana pneumonanthe; 5 – Gentiana punctata. Клоновані фрагменти позначено стрілкою

Вирівнювання порівняльний аналіз та клонованих послідовностей IGS 5S рДНК п'яти видів роду Gentiana флори України, проведені з використанням алгоритму Muscle та подальшим уточненням вручну у програмі Unipro UGENE, дало змогу виявити деякі особливості молекулярної організації цієї ділянки геному (рис. 2). Зокрема, IGS 5S рДНК досліджених представників роду Gentiana, подібно до інших видів рослин, містить на початку консервативний оліго-dT мотив, який відіграє роль ділянки термінації транскрипції. Також IGS видів Gentiana містить в положенні -30 нп АТ-багату ділянку (ТАТА-бокс), яка передує кодувальному регіону гена 5S рРНК. Раніше для модельної рослини Arabidopsis thaliana доведено, що ця ділянка – місце ініціації транскрипції (Douet, Tourmente, 2007; Layat et al., 2012). Пізніше подібні АТ-багаті ділянки знайдено і в представників кількох інших родин Покритонасінних рослин (Тинкевич та ін., 2014, 2015, 2020; Іщенко та ін., 2019; Шелифіст та ін., 2019; Volkov, Panchuk, 2014). Водночас, консервативний 5'-кінець IGS

відрізняється від *A. thaliana* та інших видів деяких родин Покритонасінних рослин модифікацією іншого консервативного елемента, котрий вважається необхідним для ініціації транскрипції (Douet, Tourmente, 2007). А саме, у досліджених видів *Gentiana* в позиції -13 нп замість GC розміщений динуклеотид AC, оточений AT-багатою послідовністю, розташованою за TATA-боксом.

Порівняльний аналіз послідовностей IGS 5S рДНК різних видів показав високий рівень подібності (93 %, відмінності лише за 27 нуклеотидами) для G. punctata i G. lutea, які належать до секції Gentiana. Майже третина з виявлених варіацій – це заміни С-Т. Відмінності між двома видами секції Pneumonanthe G. pneumonanthe i G. asclepiadea були набагато вищими (20 %). Це може свідчити про їхнє помилкове об'єднання в межах секції. Як і варто було очікувати, G. acaulis, належний до секції Ciminalis, значно відрізнявся від видів інших секцій роду Gentiana за довжиною, що зумовлено наявністю великої інсерції на початку IGS, та за нуклеотидною послідовністю – відмінності становили 15–19 %.

Пошуком у базі даних GenBank знайдено послідовності IGS 5S рДНК ще 11 видів роду Gentiana, які було залучено до подальшого аналізу молекулярної організації цієї ділянки геному. Ці види разом із назвами секцій, до яких вони належать, номерами послідовностей у базі даних GenBank та довжиною ділянки IGS у таблиці. Вирівнювання та порівняльний наведено аналіз послідовностей IGS 5S рДНК дозволили виділити дві групи видів, які значно відрізнялися за будовою цієї ділянки гена (рис. 3). До першої групи увійшли 7 альпійських видів переважно з території Європи з секції Calathianae, які характеризуються значною подібністю за послідовністю IGS. Чотири з досліджених нами видів мали будову IGS, подібну до видів секції Calathianae, і також потрапили до першої групи. Другу групу сформували три види з території Східної Азії, а також європейський G. pneumonanthe, які належать до секції *Pneumonanthe*. Найменшу за розміром ділянку IGS (218 нп) знайдено у G. rigescens, який значно відрізнявся від

111

інших видів за її послідовністю, тому при побудові філогенетичного дерева цей вид використали як зовнішню групу.

На початку IGS 5S рДНК усіх порівнюваних представників роду Gentiana розміщена Т-багата ділянка, до складу якої входять два оліго-dT мотиви, розділені кількома залишками цитозину. У всіх видів секції Calathianae, а також у G. acaulis та G. asclepiadea на початку IGS є додатковий динуклеотид АТ (у G. acaulis – GT). Головні відмінності між дослідженими видами Gentiana пов'язані з центральною частиною IGS, розташованою між консервативними ділянками, необхідними для ініціації та термінації транскрипції (рис. 3). В усіх видів, за винятком секції *Pneumonanthe*, за оліго-dT послідовністю, яка входить до складу сайту термінації, знаходиться протяжна інсерція (Ins 1, рис. 2) довжиною від 200 нп у G. lutea до 306 та 310 нп у G. acaulis та G. nivalis, котра має на початку АТбагату, а наприкінці GC-багату ділянки. Причому така будова IGS характерна й для виду G. asclepiadea, який систематики відносять до секції Pneumonanthe. Інсерція 1 має подібну нуклеотидну послідовність у видів секцій Calathianae, Gentiana та Ciminalis, головні відмінності зосереджені на її початку в перших 46 нуклеотидних позиціях. У всіх представників першої групи в цій частині IGS є відносно консервативна ділянка, відсутня у видів другої групи, у складі якої виявлено послідовність довжиною 60 нп з високою гомологією до кодувальної частини гена 5S рРНК. Виняток становить G. nivalis, у якого її немає за винятком чотирьох нуклеотидів. Саме тут розміщена послідовність, початкових гомологічна до використаного в цій роботі прямого праймера, що може бути причиною ампліфікації додаткових мінорних фрагментів (див. рис. 1). Два види G. acaulis та G. nivalis відрізняються від інших наявністю протяжних видоспецифічних ділянок (109 та 165 нп, відповідно), розташованих одразу за сайтом термінації транскрипції на початку міжгенного спейсера, і завдяки цьому мають найдовші IGS (500 та 492 нп). У видів секції Pneumonanthe на місці інсерції 1 знаходиться послідовність довжиною 36 нп.



Рис. 2 (початок). Порівняльний аналіз структури IGS 5S рДНК видів роду *Gentiana*. Фонове забарвлення використане для виділення консервативних нуклеотидів в послідовності: □ – нуклеотиди ідентичні у ≥60 %, ■ – у ≥80 %, ■ – у 100 % послідовностей. Стрілками показано дупліковані ділянки, виявлені на початку IGS



**Рис. 2** *(закінчення)*. Порівняльний аналіз структури IGS 5S рДНК видів роду *Gentiana* 



Рис. 3. Порівняльний аналіз структури ділянки IGS 5S рДНК видів роду *Gentiana*. Фонове забарвлення використане для виділення консервативних нуклеотидів у послідовності: □ – нуклеотиди ідентичні у ≥25 %, □ – у ≥75 %, □ – у 100 % послідовностей. І та II – групи видів, виділені за подібністю ділянки IGS

За інсерцією 1 розташована ділянка, яка має досить високу подібність у всіх порівнюваних видів, але у видів секції *Pneumonanthe* вона переривається двома інсерціями (Ins 2 та Ins 3, рис. 3): Т-багатої послідовності довжиною 19 нп (позиції 363–381) та АТ-багатої ділянки довжиною 127 нп (позиції 434–560). *G. pneumonanthe* та три азійські види секції відрізняються наявністю у останніх вставки довжиною 39 нп в позиції 156 (на початку інсерції 3).

Аналіз нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК різних видів роду *Gentiana* також виявив у деяких із них наявність дуплікації протяжних ділянок на початку IGS, довжина якої становить 52 нп у видів секції *Pneumonanthe*, 80 нп у *G. acaulis* та 82 нп у *G. nivalis* (рис. 4).

G.pneumon	anthe	*	20	*	40	*
cons.	: CTTTT	CCTTTTTT	TCG T CTAT	TTCTT TT	CACT GTTTTC	CGTCT T
1-52	:	G • • • • • • • •	•••T•A••••	·C····T··	• • • • C • • • • •	••••CC• :52
53-104	:	A • • • • • • • •	···c·c····	·A····C··	• • • • A • • • • •	•••••TT• :52
G.acaulis		*	20	*	40	*
cons.	: CAATTA	TT GAA	TCGGTT ATC	C AACC CAT	ССАТАТТА (	CA A
44-123	:	·G·TG·C··	• • • • • • <del>T</del> • • •	A····C···	•••••AG	••AA•C :50
124-203		•A•CA•A••	• • • • • • • A • • •	G····A···	•••••TA	••CG•G :50
		60	*	80		
cons.	: TTATAT	TA TTCGTAA	ATACAC T	гт т		
44-123	:	•A•••••	A••••T•	••GTT• :80		
124-203		• C • • • • • • •	т	••AAA• :80		
Gnivalie		*	20	*	40	*
CODE .		······································	∠∪ ∆₽₽₽₽₽₽₽₽	CCASACCCA	30 00000000000000000000000000000000000	Cache
_1_79 .	CCCIAIC			T	CITACGIAIC	•19
90-150 .						
160-220		********	····0.			ATT •50
100-239 :		60	*******	en		AL. IDU
	<u>አሞርአ «እ(</u>		ACCACACCC			
_1_70 .	AICAYA	JIGCAICCGC	AUJJADAJDA		. 02	
-4-79 :				A.	.02	
160 220 -	••••T•	********			. 0.1	
100-239 :	******	********	********		10T	

**Рис. 4.** Вирівнювання повторюваних ділянок, розташованих за сайтом термінації транскрипції у деяких видів *Gentiana*. Цифрами вказано номери нуклеотидних позицій від початку IGS, cons. – консенсусна послідовність

Ці частини спейсера видоспецифічні і містять оліго-dT та мікросателітні повтори, що наводить на думку про можливу роль нерівної рекомбінації у їх виникненні. У *G. nivalis* ампліфікована ділянка повторена три рази й охоплює 4 нуклеотиди з кодувальної частини 5S рДНК. Саме ці дуплікації і є причиною суттєвого збільшення розміру IGS у згаданих видів порівняно із іншими.

На філогенетичній дендрограмі, побудованій за алгоритмом правдоподібності вирівнювання основі максимальної на 5S рДНК, послідовностей IGS згідно ВИДИ згрупувалися 3 належністю до секцій, визначених раніше в межах роду (рис. 5). Види секції Pneumonanthe – G. triflora, G. scabra і G. manshurica, рівень ідентичності послідовностей IGS яких між собою становить 87-95 %, сформували один кластер. До другого увійшли види з секції Calathianae з ідентичністю послідовностей IGS в межах 84-94 % за винятком G. nivalis, для якого цей показник становить 79 %.

Чотири досліджені нами види G. lutea, G. punctata, G. acaulis i G. sclepiadea розташувалися у складі групи І, хоча і дещо відокремлено від секції Calathianae. Три перші належать до секцій Gentiana та Ciminalis. G. asclepiadea поки що не має чітко визначеного таксономічного положення, оскільки різні дослідники на основі порівняльного аналізу певних ознак зараховували цей вид до різних секцій. Так, досить тривалий час його включали до секції Pneumonanthe (Tutin, 1972). Цитогенетичний аналіз показав, що основне хромосомне число видів цієї секції становить х=13 (2n=2x=26). G. asclepiadea вважався винятком, оскільки його хромосомний набір складав 2n=36 і 44 (дві цитологічні раси) (Yuan et al., 1996; Mel'nyk et al., 2014). Проте на основі результатів порівняльного аналізу послідовностей ядерних (35S рДНК) та пластидних (atpB-rbcL, trnL-F) генів він був віднесений до секції Gentiana (Favre et al., 2014). Водночас, систематики звертають увагу на морфологічні відмінності G. asclepiadea від видів цієї секції і пропонують відносити його до монотипової секції (Struwe et al., 2002). За нашими результатами, ідентичність ділянки IGS 5S рДНК

G. asclepiadea та видів G. lutea і G. punctata становить 82 і 83 %, що також свідчить про спорідненість цього виду з представниками секції Gentiana.



**Рис. 5.** Філогенетична дендрограма видів роду *Gentiana*, побудована на основі нуклеотидної послідовності IGS 5S рДНК за алгоритмом максимальної правдоподібності (maximum likelihood). У ролі зовнішньої групи використано *G. rigescens*. Цифри біля вузлів показують значення бутстреп-підтримки, розраховані у відсотках для 1000 реплікацій. \*\*\* – приналежність *G. asclepiadea* до однієї з наведених секцій роду (*Pneumonanthe*) має суперечливий характер і не визначена остаточно

Отримані дані свідчать також про те, що еволюція послідовності IGS гена 5S рРНК досліджених азійських та європейських видів роду Тирлич із двох різних центрів походження цих рослин відбувалася незалежно в різних напрямках впродовж тривалого періоду, наслідком чого стала значна їх дивергенція за цією ознакою. Крім того, у досліджених видів помічена тенденція до збільшення довжини міжгенного спейсера: лише в одного виду вона становить трохи більше 200 нп, у решти – від 300 до 500 нп.

### ВИСНОВКИ

Ділянка міжгенного спейсера генів 5S рРНК у п'яти досліджених видів роду Gentiana флори України представлена одним варіантом повторів і містить типові для інших родин Покритонасінних рослин мотиви, зокрема консервативний оліго-dT мотив на початку IGS, який відіграє роль ділянки термінації транскрипції, та АТ-багату кодувальному регіону, ділянку, котра передує водночас GC-елемент у ділянці ініціації транскрипції консервативний замінений на динуклеотид АС. Аналіз цих та ще 11 європейських та Gentiana азійських видів роду показав, ЩО IGS 5S рДНК характеризується значним міжвидовим поліморфізмом, що може бути використане для уточнення філогенетичних відносин між представниками роду *Gentiana*. Результати порівняльного аналізу послідовності нуклеотидної IGS загалом узгоджуються **i**3 загальноприйнятими уявленнями про систематику роду за винятком виду із спірним таксономічним положенням G. asclepiadea, який за даними проведеного аналізу споріднений з представниками секції Gentiana.

Роботу проведено за часткової фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017—2021 рр.) в рамках проекту: «Генетичний контроль і біохімічні властивості організмів за патологічних і стресових станів та їх важливість для розробки діагностики і терапії», а також за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (грант № 0118U000137).

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 1. Андрєєв IO, Мельник ВМ, Мирюта ГЮ, Кунах ВА. (2017) Поліморфізм міжгенного спейсера генів 5S рРНК деяких видів роду Gentiana L. *Факт. Експ. Евол. Орг.* **20**: 42-46.
- 2. Мельник ВМ, Андрєєв IO, Мирюта ГЮ, Шелифіст АЄ, Волков РА, Кунах ВА. (2020) Молекулярна організація міжгенного

спейсера 5S рДНК Gentiana pneumonanthe L. i G. punctata L. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. **18**(1-2): 9-15.

- 3. Douet J, Tourmente S. (2007) Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*. **99**: 5-13
- 4. Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**(5): 1792-1797.
- Favre A, Matuszak S, Sun H, Liu E, Yuan Y, Muellner-Riehl A. (2014) Two new genera of Gentianinae (Gentianaceae): *Sinogentiana* and *Kuepferia* supported by molecular phylogenetic evidence. *Taxon.* 63(2): 342-354.
- 6. Favre A, Yuan Y, Küpfer P, Alvarez N. (2010) Phylogeny of subtribe Gentianinae (Gentianaceae): Biogeographic inferences despite limitations in temporal calibration points. *Taxon*. **59**(6): 1701-1711.
- Gielly L, Taberlet P. (1994) The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Mol Biol Evol.* 11(5): 769-777.
- Gielly L, Yuan YM, Küpfer P, Taberlet P. (1996) Phylogenetic use of noncoding regions in the genus *Gentiana* L.: Chloroplast trnL (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 5(3): 460-466.
- 9. Hammerli M. (2007) Molecular aspects in systematics of *Gentiana* Sect. *Calathianae* Froel. Theses for obtaining scient. degree of Dr. of Sci. Neuchâtel. Retrieved from: https://doc.rero.ch/record/8521/files/these\_HaemmerliM.pdf
- 10. Ho T-N, Liu S-W, Lu X-F. (1996) A phylogenetic analysis of *Gentiana* (Gentianaceae). *Acta Phytotax. Sin.* **34**(5): 505-530.
- 11.Ho T-N, Liu S-W. (1990) The infrageneric classification of *Gentiana* (Gentianaceae). *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.)*, *Bot.* 20(2): 169-192.

- 12. Hungerer KB, Kadereit JW. (1998) The phylogeny and biogeography of *Gentiana* L. sect. Ciminalis (Adans.) Dumort.: A historical interpretation of distribution ranges in the European high mountains. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **1**(1): 121-135.
- 13. Jensen SR, Schripsema J. (2002) Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. In: Struwe L, Albert VA (eds.). Gentianaceae – Systematics and Natural History. *Cambridge University Press, Cambridge*: 573-632.
- 14. Kunakh VA, Mel'nyk VM, Drobyk NM, Andreev IO, Spiridonova KV, Twardovska MO, Konvalyuk II, Adonin VI. (2015) Genetic variation induced by tissue and organ culture in *Gentiana* species.
  In: Rybczyński JJ, Davey MR, Mikula A (eds.). The Gentianaceae.
  Vol. 2. Biotechnology and Applications. *Springer Heidelberg, New York, Dordrecht, London*: 199-238.
- 15.Küpfer Ph, Yuan Y-M. (1996) Karyological studies on *Gentiana* sect. Chondrophyllae (Gentianaceae) from China. *Plant Syst. Evol.* 200: 161-176.
- 16. Madeira F., Park Y.M., Lee J. et al. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47(W1): W636-W641.
- 17. Mel'nyk VM, Drobyk NM, Twardovska MO, Kunakh VA. (2014) Karyology of European species of genus *Gentiana* L. In: Rybczyński JJ, Davey MR, Mikula A (eds.). The Gentianaceae. Vol.
  1. Characterization and Ecology. *Springer Heidelberg, New York,* Dordrecht, London: 219-230.
- 18.Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M. (2012) UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 28(8): 1166-1167.
- 19. Pringle JS. (1967) Taxonomy of *Gentiana*, section *Pneumonanthae*, in Eastern North America. *Brittonia*. **19**(1): 1-32.
- 20.Rogers I., Bendich A. (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol.* **5**: 69-76.

- 21. Struwe L, Kadereit J, Klackenberg J, Nilsson S, Thiv M, von Hagen KB, Albert VA. (2002) Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification. In: Struwe LV, Albert A (eds.). Gentianaceae Systematics and Natural History. *Cambridge University Press*, *Cambridge*: 21-309.
- 22. Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis*Nucleic Acids Res.* **44**(W1): W232-W235.
- 23. Tutin TG. (1972) Gentianaceae. In: Tutin TG, Haywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds.). Flora Europea, Vol. 3. *Cambridge Univ Press, Cambridge*: 59-63.
- 24. Wong KL, But PH, Shaw PC. (2013) Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal *Gentiana* species and their adulterants. *Chin. Med.* **8**(1): 16.
- 25. Yuan Y.-M., Küpfer Ph. (1993) Karyological studies on *Gentiana* sect. Frigida s.l. and sect. Stenogyne (Gentianaceae) from China. *Bull. Soc. Neuchatel. Sci. Nat.* **116**(2): 65-78.
- 26. Yuan Y.-M., Küpfer Ph. (1997) The monophyly and rapid evolution of *Gentiana* sect. Chondrophyllae Bunge s.l. (Gentianaceae): evidence for nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Bot. J. Linn. Soc.* **123**: 25-43.
- 27. Yuan Y-M, Küpfer Ph, Doyle JJ. (1996) Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Am. J. Bot.* **83**(5): 641-652.
- 28. Yuan Y-M, Küpfer Ph, Zeltner L. (1997) Chromosomal evolution of Gentiana and Jaeschkea (Gentianaceae), with further documentation for 35 species from China. Pl. Syst. Evol. 210: 231-247.
- **29.**Yuan Y-M. (1993) Karyological studies on *Gentiana* sect. *Cruciata* (Gentianaceae) from China. *Caryologia*. **46**: 99-114.

# **5S РИБОСОМНА ДНК ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ SOLANACEAE**

### Ю.О. Тинкевич, А.Є. Шелифіст, Р.А. Волков

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Завдяки наявності в геномі у всіх еукаріотичних організмів ділянки, яка кодує 5S рРНК, (5S рДНК) являє собою універсальну модель молекулярної еволюції тандемно організованих вивчення ЛЛЯ послідовностей. Втім. повторюваних родині Пасльонові V (Solanaceae) молекулярна організація 5S рДНК досліджена лише для кількох родів. Нами проаналізовано будову міжгенної спейсерної ділянки (intergenic spacer, IGS) 5S рДНК 15 видів з 11 родів родини Пасльонових. Довжина IGS 5S рДНК у представників цієї родини варіює в широких межах, від 103 до 341 нп, а рівень міжвидової подібності – від 21,3 до 85,9 %. ІGS представників різних родів демонструють значну подібність лише у ділянках, які відповідають потенційним зовнішнім елементам промотора та термінатора РНКполімерази III. Мутації, котрі виникають у зоні IGS перед кодувальною ділянкою, часто мають компенсаторний характер, що забезпечує збереження зовнішніх елементів промотора протягом еволюції.

### ВСТУП

Перспективним об'єктом для вивчення питань молекулярної еволюції є родина Пасльонові (Solanaceae) – одна з найбільших серед Покритонасінних рослин (Olmstead et al., 2008; Ganaie et al., 2018; Ranaweera et al., 2018). Нині систематики включають до складу родини близько 2700 видів із 90—100 родів. Приблизно половина всього видового різноманіття Solanaceae припадає на рід *Solanum* (Knapp et al., 2004; Echeverría - Londoño et al., 2020). Для Пасльонових характерна широка екологічна пластичність. У складі родини є багаторічні дерева та трав'янисті однорічні види, поширені в найрізноманітніших середовищах існування, від пустель до тропічних лісів. Багато представників родини важливі у господарському плані рослини (Knapp et al., 2004; Barboza et al., 2016; Kaunda et al., 2019).

Генетичні особливості представників родини вивчені нерівномірно. Для деяких культурних видів (картопля, томат, баклажан та ін.) та модельних генетичних об'єктів (тютюн) повністю сиквеновано й анотовано геноми, активно вивчається генетичне різноманіття (Wang, Bennetzen, 2015; Gebhardt, 2016; Chen et al., 2019). Досягнуті значні успіхи і в розумінні еволюції Пасльонових. Так, за оцінками, зробленими на основі молекулярних методів, ця родина відокремилася приблизно 35-51 мільйони років тому, однак неабиякої різноманітності вона досягла значно пізніше (Wilf et al., 2017). Водночас для багатьох груп родини Solanaceae відсутні молекулярно-генетичні дослідження, практично ШО обмежує можливості аналізу еволюції та філогенії такої великої та важливої групи рослин.

Популярними та перспективними молекулярними маркерами, які лише фрагментарно використовувалися у дослідженнях родини Solanaceae (Borisjuk et al., 1994; Volkov et al. 1999; Park et al., 2000; Volkov et al., 2001; Komarova et al., 2008; Saini et al., 2009; Matyášek et al., 2012; Volkov et al., 2017; de Souza et al., 2019), є некодувальні (спейсерні) послідовності рДНК (ділянок геному, які кодують рРНК). Завдяки наявності рДНК у геномах усіх організмів, вона універсальну становить модель ДЛЯ вивчення молекулярної еволюції тандемно організованих повторюваних послідовностей. Зокрема, порівняльний аналіз міжгенної спейсерної ділянки (intergenic spacer, IGS) 5S рДНК з успіхом використовується у таксономічних дослідженнях (Volkov et al., 2001; Saini, Jawali, 2009; Mlinarec et al., 2016; Bolsheva et al., 2017; Simeone et al., 2018; Tynkevich, Volkov, 2019).

5S рДНК належать до класу тандемно організованих повторюваних послідовностей, уміст яких у геномі коливається від менш, як за 1000 до понад 75000 копій (Cloix, Tutois, 2000; Simon et al., 2018; Feng et al., 2018). Кожна повторювана одиниця (повтор) складається з висококонсервативної кодувальної ділянки та IGS, який еволюціонує з високою швидкістю (Barciszewska et al., 2001; Simon et al., 2018; de Souza et al., 2019). У кодувальній ділянці, яка у більшості організмів має довжину 120 нп, розташовані внутрішні елементи промотора РНК-полімерази III. Водночас, послідовності IGS варіабельні за довжиною та нуклеотидною послідовністю. Проте в них також наявні відносно консервативні мотиви, а саме: зовнішні елементи промотора та термінатор РНК-полімерази III (Volkov et al., 2001; Cloix et al., 2003; Leśniewska, Boguta, 2017; Sergeeva et al., 2017; Simon et al., 2018).

Враховуючи, що організація 5S рДНК ще залишається вивченою лише для обмеженої кількості представників родини Пасльонових (Park et al., 2000; Volkov et al., 2001; Davidjuk et al., 2010; Давидюк та ін., 2013; Sun et al., 2014; Volkov et al., 2017; Шелифіст та ін., 2018; Шелифіст та ін., 2019), ми поставили за мету провести порівняльний аналіз молекулярної організації IGS 5S рДНК представників чотирьох найбільших (із семи наявних) підродин родини Solanaceae, а саме Nicotianoideae i Solanoideae (клада «х=12»), а також Cestroideae та Petunioideae (Olmstead et al.,

125

2008). Для цього аналізу використані послідовності IGS 14 видів родини Solanaceae, раніше отримані у нашій лабораторії або іншими авторами. Також була вперше розшифрована послідовність IGS представника таксономічно важливого роду *Physalis, Ph. peruviana*.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для дослідження нами використано гербаризований матеріал *Ph. peruviana*, отриманий з Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України. Загальну ДНК ізолювали з листків згідно зі стандартною методикою (Porebski et al., 1997).

Ампліфікацію повторюваної ділянки 5S рДНК, клонування ПЛР-продуктів у плазмідний вектор та сиквенування проводили, як описано нами раніше (Шелифіст та ін., 2019). Первинну обробку отриманих нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою програми Chromas та пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR. Пошук гомологічних послідовностей у базі даних GenBank здійснювали з використанням програми BLAST (Altschul et al., 1997).

Для множинного вирівнювання нуклеотидних послідовностей застосовували онлайн-сервіс програми MAFFT (Katoh et al., 2019). Згідно з рекомендаціями розробників програми використовували метод E-INS-і, найефективніший для вирівнювання дивергованих послідовностей із кількома гомологічними доменами, розділеними інделами (Katoh, Standley, 2013).

# РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

ПЛР-продукти 5S рДНК *Ph. peruviana* лігували у плазмідний вектор рЈЕТ1.2 та трансформували отриманими плазмідними конструкціями клітини *E. coli*. Після виділення препаратів плазмідної ДНК та перевірки на наявність вставки, позитивні клони відбирали для подальшого сиквенування. Отримані полінуклеотидні послідовності порівнювали з наявними у GenBank послідовностями 5S рДНК представників інших родів родини Solanaceae (табл. 1).

# **Таблиця 1.** Характеристика міжгенного спейсера 5S рДНК видів родини Solanaceae

Назва виду	Назва клону	GenBank Acc. No	Довжи- на IGS, нп	Вміст GC- пар, %	Посилання
Solanum bulbocastanum Dunal	Sobul2	AJ226012	189	50,79	Volkov et al., 2001
<i>S. okadae</i> Hawkes & Hjert.	Sooka5	AJ226066	220	49,09	Volkov et al., 2001
<i>S. circaeifolium</i> Bitter	Socir3	AJ226018	229	50,22	Volkov et al., 2001
S. lycopersicum L.	Solyc	X55697	235	45,96	Lee, Nazar, 1990, unpubl.
S. melongena L.	Somel1	HM042870	198	48,99	Davidjuk et al., 2010
Datura metel L.	Damet	AY334494	231	51,77	Tsim et al., 2003, unpubl.
<i>Physalis peruviana</i> L.	Phper7		206	55,34	Ця стаття
<i>Lycianthes rantonnetii</i> (Carrière) Bitter	Lyran3	MK638984	183	53,55	Grabiele et al., 2019, unpubl.
Atropa belladonna L.	Atbel5	KY126362	138	34,06	Volkov et al., 2017
<i>Cestrum elegans</i> (Brongn. ex Neumann) Schltdl.	Ceele	AF495739	214	45,33	Sykorova et al., 2003
<i>Capsicum baccatum</i> L.	Cabac	AF217951	180	47,78	Park et al., 2000
Mandragora autumnalis Bertol.	Maaut2		103	26,21	Шелифіст та ін., 2019
<i>Nicotiana sylvestris</i> Speg. & Comes	Nisyl4	AJ131171	312	33,33	Fulnecek et al., 2002
<i>Brunfelsia uniflora</i> (Pohl) D. Don	Bfuni21	MH277105	223	34,98	Шелифіст та ін., 2018
<i>Petunia hybrida</i> hort. ex E.Vilm.	pHWH5a	X07930	341	41,94	Frasch et al., 1989

У результаті аналізу сиквенованих послідовностей з'ясовано, що довжина IGS 5S рДНК у представників родини Solanaceae варіює в широких межах, від 103 у *M. autumnalis* до 341 нп у *P. hybrida* (табл. 1). Також встановлено, що *M. autumnalis* притаманний найнижчий вміст GC-пар у IGS, а саме 26,2 %. Найвище значення цей показник має у *Ph. peruviana* – 55,3 %. Отже, у представників родини Solanaceae вміст GC-пар у IGS змінюється у дуже широких межах.

Вирівнювання послідовностей IGS 5S рДНК представників родини Solanaceae проведено методом E-INS-I (Katoh, Standley, 2013), який вважається оптимальним для дивергованих нуклеотидних послідовностей зі значною різницею у довжині (рис. 1).



Рис. 1. Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК представників родини Solanaceae. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1. Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: — – менше 60 %, — – 60-80 %, — – 80-100 %, — – 100 %

За результатами вирівнювання обчислений відсоток подібності між IGS різних видів, який змінюється у дуже широких межах, від 21,3 до 85,9 % (табл. 2). Привертає увагу, що два види, N. sylnestris та *P. hybrida*, демонструють найнижчий рівень подібності при порівнянні з усіма іншими. Це можна пояснити тим, що N. sylnestris та P. hybrida містять у IGS довгі інсерції, для яких у решти видів немає гомологічних ділянок. Якщо виключити ці два види з розгляду, то рівень подібності IGS решти 13 видів буде становити від 51,0 до 85,9 %. При цьому найбільша подібність, від 77,1 до спостерігається S. bulbocastanum, між 85,9 %, S. okadae, S. circaeifolium та S. lycopersicum, чотирма представниками підроду Solanum (Nee, 1999) роду Solanum. Відповідно, рівень подібності IGS для представників різних родів перебуває в межах від 51,0 до 72,9 %. Цікаво, що IGS S. melongena має відносно малу подібність з IGS інших видів роду Solanum – від 62,0 до 68,2 %, що свідчить про суттєву дивергенцію видів у межах цього роду.

При порівнянні послідовностей IGS представників різних родів родини Solanaceae найвищу подібність виявлено для двох ділянок, розташованих на 5'- та 3'-кінцях спейсера (рис. 1). Аналіз цих фрагментів показав (рис. 2), що в них є мотиви, які ймовірно беруть участь в ініціації та термінації транскрипції 5S рРНК.

Відомо, що транскрипцію генів 5S рРНК забезпечує РНКполімераза III. При цьому для ініціації транскрипції необхідні як внутрішні елементи промотора, розташовані у кодувальній ділянці, так і зовнішні елементи, наявні у IGS перед кодувальною ділянкою (Douet, Tourmente, 2007; Layat et al., 2012; Leśniewska, Boguta, 2017). Зона термінації транскрипції локалізована на початку IGS (Cloix et al., 2003).

Вважається, що типова послідовність термінатора транскрипції для генів 5S рРНК у Покритонасінних складається з чотирьох залишків тиміну, розташованих поспіль на початку IGS (Cloix et al., 2003). Наявність такої мінімальної термінаторної послідовності, як і довших оліго-dT ланцюжків на 5'-кінці IGS була показана для багатьох груп рослин (Negi et al., 2003; Garcia et al., 2009; Volkov, Panchuk, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Іщенко та ін., 2019; de Souza et al., 2019). У всіх проаналізованих IGS Пасльонових також знайдена оліго-dT послідовність, як зразу після кодувальної ділянки, так і відокремлена від неї одним або двома нуклеотидами. Лише у *C. baccatum* потенційний термінатор починається з шостої позиції спейсера.



**Рис 2.** Структурна організація початкової та кінцевої ділянок IGS 5S рДНК видів родини Solanaceae. Pr1 та Pr2 – праймери 5S-14a та 5S-15, відповідно. Вказано розташування оліго-dT послідовності термінатора та передбачуваних зовнішніх елементів промотора РНК-полімерази III. Характеристики клонів наведено у табл. 1

Таблиця 2. Рівень подібності (%) IGS 5S рДНК представників родини Solanaceae

Cabac Maaut2 MysiN	56,8 57,8 36,5 5	59,1 53,6 37,5 6	55,2 51,0 34,4 5	57,3 52,1 35,4 5	56,5 56,2 34,9 6	53,6 56,0 32,6 6	66,1 58,9 38,3 6	66,9 65,6 34,4 6	71,4 75,3 33,9 5	53,4 51,6 35,9 5	100 61,5 29,7 5	100 29,7 5	100 4			
Athel5 91997	62,5 59,4	64,6 62,2	59,4 62,5	58,6 64,3	58,9 60,2	58,6 58,6	66,4 60,9	72,9 58,1	100 57,8	100						
Рһрег7 Lyran3	63,8 61,5	66,4 64,8	68,5 66,4	65,1 64,8	64,6 60,9	63,5 65,9	100 68,2	100								
Somet Damet	2,0 61,5 0	4,8 66,7 0	8,2 66,7 0	4,6 66,7 0	00 67,7 0	100										
ολίος	,1 77,1 6	,9 83,1 6	0 82,8 6	100 6	1											
Sesters	83,6 83	100 85	10													
Kindo Kindo	obul2 100	ooka5	ocir3	olyc	omel1	amet	hper7	yran3	thels	Geele	abac	Aaaut2	Visyl4	lfuni21	ehyb5a	

Примітка. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1

В зоні термінації на 5'-кінці IGS наявна ділянка довжиною 15 нп, яка має суттєвий рівень подібності у переважної більшості досліджених видів (рис. 1, 2). Єдиний виняток – *C. baccatum:* у цього виду консервативна ділянка у зоні термінації містить вставку, яка складається з 15 залишків тимідину та 5 – цитозину (рис. 2). Наявність консервативної ділянки на 5'-кінці IGS можна пояснити дією стабілізаційного добору, пов'язаною з її функціональним значенням. Цікаво, що до складу консервативної ділянки належать не тільки оліго-dT, але й інші послідовності, можливе функціональне значення яких незрозуміле.

У представників родини Solanaceae консервативна ділянка довжиною 29 нп наявна і на 3'-кінці IGS, де мають бути зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III. В *Arabidopsis thaliana*, ці елементи представлені трьома мотивами, серед яких так званий ТАТА-бокс – шестинуклеотидна послідовність у позиції -28 нп від 5'-кінця кодувальної ділянки 5S рРНК (Cloix et al., 2003; Douet, Tourmente, 2007). Іншими зовнішніми елементами промотора РНКполімерази III, виявленими у *A. thaliana*, є GC-динуклеотид у положенні -12 від 5'-кінця кодувальної ділянки та залишок цитозину у положенні -1 (Cloix et al., 2003; Douet, Tourmente, 2007).

Детальний аналіз З'-кінцевої ділянки IGS представників родини Solanaceae показує, що початок ТАТА-подібного мотиву у них розміщений у позиції -29 нп та збігається з початком всієї консервативної зони. Послідовність цього мотиву у Пасльонових виглядає так: ТТААТА. Цим мотивом починається консервативний олігонуклеотидний ТА-багатий блок з 13 нп (рис. 2).

GC-динуклеотид у більшості досліджених видів Solanaceae розташований у типовій позиції -12 (рис. 2). Проте у чотирьох видів: *L. rantonnetii, A. belladonna, C. elegans* та *M. autumnalis,* в його складі спостерігаються нуклеотидні заміни. Але у цих видів як результат ще однієї нуклеотидної заміни виник GC-динуклеотид у положенні -14. Ще у трьох видів помічено дублювання цього мотиву в обох позиціях.

В останній позиції IGS у представників родини Solanaceae переважно виявляється цитозин, який у п'яти видів замінений на тимін. Відповідно, складається враження, що для роботи РНКполімерази III важлива наявність у цій позиції піримідинової основи. Зазначимо, що залишок тиміну у положенні -1 зустрічається також у представників родини Fagaceae (Tynkevich, Volkov, 2019), тоді як у Fabaceae, Rosaceae, Sapindaceae та Poacea залишок цитозину в цій позиції дуже консервативний (Tynkevich, Volkov, 2014; Volkov, Panchuk, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Русак та ін., 2016; Ishchenko et al., 2018).

### ВИСНОВКИ

Отже, наявні дані свідчать, що нуклеотидні мотиви, які можуть бути задіяні у транскрипції 5S рРНК, є лише відносно консервативними в межах родини Пасльонові. На загал, як у зоні термінації, так і ініціації транскрипції не знайдено навіть динуклеотидного мотиву, який був би ідентичним у всіх представників родини. Для пояснення характеру мінливості елементів промотора/термінатора у різних групах рослин, зокрема – у Пасльонових, можна запропонувати два пояснення: або взаємодія факторів ініціації/термінації транскрипції з IGS не жорстко специфічна та може поширюватися на певний спектр мотивів, або ці нуклеотидних білки зазнають коеволюції 3 відповідними послідовностями IGS. Складається враження, що механізми транскрипції 5S рДНК можуть дещо відрізнятись у різних таксонах і потребують додаткового вивчення.

# СПИСОК ЛІТЕТАТУРИ

- 1. Давидюк ЮМ, Молода ОО, Волков РА. (2013) Молекулярна організація 5S рДНК *Solanum betaceum* Cav. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* **11**(1): 14-19.
- 2. Іщенко О, Панчук I, Волков Р. (2019) Організація 5S рДНК клена польового (*Acer campestre* L.) *Біологічні системи*. **11**(1): 40-45.

- 3. Русак ОО, Петращук ВІ, Панчук II, Волков РА. (2016) Молекулярна організація 5S рДНК двох українських популяцій явора (*Acer pseudoplatanus*). Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 14(2): 216-220.
- 4. Тинкевич ЮО, Невельська АО, Чорней II, Волков РА. (2015) Організація та мінливість міжгенного спейсера 5S рДНК *Lathyrus venetus*. *Bich*. *Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. **13**(1): 81-87.
- 5. Шелифіст АЄ, Тинкевич ЮО, Волков РА. (2018) Молекулярна організація 5S рДНК *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *Bicн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* **16**(1): 61-68.
- 6. Шелифіст АЄ, Якобишен ДВ, Волков РА. (2019) Молекулярна будова рДНК *Mandragora autumnalis* Bertol. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* **17**(2): 187-195.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- 8. Barboza GE, Hunziker AT, Bernardello G et al. (2016) Solanaceae. In: *Flowering plants. Eudicots*, Springer, Cham.
- Barciszewska MZ, Szymañski M, Erdmann VA, Barciszewski J. (2001) Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim. Polon.* 48(1): 191-198.
- 10. Bolsheva NL, Melnikova NV, Kirov IV et al. (2017) Evolution of blue–flowered species of genus *Linum* based on high–throughput sequencing of ribosomal RNA genes. *BMC Evol. Biol.* **17**(2): 24-64.
- Borisjuk N, Borisjuk L, Petjuch G, Hemleben V. (1994) Comparison of nuclear ribosomal RNA genes among *Solanum* species and other Solanaceae. *Genome*. 37(2); 271-279.
- 12. Chen F, Song Y, Li X, Chen J, Mo L, Zhang X, Lin Z, Zhang L. (2019) Genome sequences of horticultural plants: past, present, and future. *Hortic. Res.* 6: 112.
- 13. Cloix C, Tutois S. (2000) Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genom Res.* **10**: 679-690.

- 14. Cloix C, Yukawa Y, Tutois S, Sugiura M, Tourmente S. (2003) In vitro analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant J.* **35**(2): 251-226.
- 15. Davidjuk YM, Hemleben V, Volkov RA. (2010) Structural organization of 5S rDNA of eggplant, *Solanum melongena* L. *Biolohichni systemy*. 2(1): 3-6.
- 16. De Souza TB, Gaeta ML, Martins C, Vanzela ALL. (2019) IGS sequences in *Cestrum* present AT-and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol. Biol. Reports.* 47(1): 55-66.
- 17. Douet J, Tourmente S. (2007) Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in Arabidopsis thaliana and Xenopus laevis. Heredity. 99: 5-13.
- Echeverría Londoño S, Särkinen T, Fenton IS, Purvis A, Knapp S. (2020) Dynamism and context dependency in diversification of the megadiverse plant genus Solanum (Solanaceae). J. Syst. Evol. 58(6): 767-782.
- 19. Feng S, Zhu Y, Yu C, Jiao K, Jiang M, Lu J, Shen C, Ying Q, Wang H. (2018) Development of species-specific SCAR markers, based on a SCoT analysis, to authenticate *Physalis* (Solanaceae) species. *Front. Genet.* **9**: 192.
- 20. Ganaie M, Raja V, Reshi ZA, Verma V. (2018) Family Solanaceae: Taxonomy and modern trends. *Ann. Plant Sci.* **7**(9): 2403-2414.
- 21.Garcia S, Lim KY, Chester M, Garnatje T, Pellicer J, Vallès J, Leitch AR, Kovařík A. (2009) Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. *Chromosoma*. **118**(1): 85.
- 22. Gebhardt C. (2016) The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theor. Appl. Genet.* **129**(12): 2281-2294.
- 23. Ishchenko OO, Panchuk II, Andreev IO, Kunakh VA, Volkov RA.
  (2018) Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschapmpsia antarctica*. *Cytol. Genet.* **52**(6): 416-421.

- 24. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform*. **20**(4): 1160-1166.
- 25.Katoh K, Standley DM. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Boil. Evol.* **30**(4): 772-780.
- 26.Kaunda JS, Zhang YJ. (2019) The genus *Solanum*: an ethnopharmacological, phytochemical and biological properties review. *Natural Products and Bioprospecting*. **9**(2): 77-137.
- 27.Knapp S, Bohs L, Nee M, Spooner DM. (2004) Solanaceae a model for linking genomics with biodiversity. *Comp. Funct. Genomics.* **5**(3): 285-291.
- 28.Komarova NY, Grimm GW, Hemleben V, Volkov RA. (2008) Molecular evolution of 35S rDNA and taxonomic status of *Lycopersicon* within *Solanum* sect. *Petota. Plant Syst. Evol.* 276(1-2): 59-71.
- 29. Layat E, Sáez-Vásquez J, Tourmente S. (2012) Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis. Plant Cell Physiol.* **53**(2): 267-276.
- 30. Leśniewska E, Boguta M. (2017) Novel layers of RNA polymerase III control affecting tRNA gene transcription in eukaryotes. *Open Biol.* 7(2): 170001.
- 31. Matyášek R, Renny-Byfield S, Fulneček J, Macas J, Grandbastien MA, Nichols R, Leitch A, Kovařík A. (2012) Next generation sequencing analysis reveals a relationship between rDNA unit diversity and locus number in *Nicotiana* diploids. *BMC Genomics*. **13**(1): 722.
- 32. Mlinarec J, Franjević D, Bočkor L, Besendorfer V. (2016) Diverse evolutionary pathways shaped 5S rDNA of species of tribe Anemoneae (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Bot. J. Linn. Soc.* **182**(1): 80-99.
- 33.Nee M. (1999) Synopsis of *Solanum* in the New World. In: Solanaceae IV: Advances in biology and utilization. *Royal Botanic Gardens, Kew*: 285-333.

- 34. Negi MS, Rajagopal J, Chauhan N, Cronn R, Lakshmikumaran M. (2002). Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides*. *Genome*. **45**(6): 1181-1188.
- 35.Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF, Collier SM. (2008) A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*. 57(4): 1159-1181.
- 36.Park YK, Park KC, Park CH, Kim NS. (2000) Chromosomal localization and sequence variation of 5S rRNA gene in five *Capsicum* species. *Mol. Cells.* **10**(1): 18-24.
- 37. Porebski S, Bailey LG, Baum BR. (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* **15**: 8-15.
- 38. Ranaweera LT, Hancock JF, Weebadde CK, Sooriyapathirana SDSS. (2018) Phylogeographic and phylogenetic analyses of selected set of wild and naturalized *Solanum* spp. in Sri Lanka. *Ceylon J. Sci.* **47**(1): 85-93.
- 39. Saini A, Jawali N. (2009) Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* **280**(3-4): 187-206.
- 40. Sergeeva EM, Shcherban AB, Adonina IG, Nesterov MA, Beletsky AV, Rakitin AL, Mardanov AV, Ravin NV, Salina EA. (2017) Fine organization of genomic regions tagged to the 5S rDNA locus of the bread wheat 5B chromosome. *BMC Plant Biol.* **17**(1): 183.
- 41. Simeone M.C., Cardoni S., Piredda R., Imperatori F., Avishai M., Grimm G.W., Denk T. (2018) Comparative systematics and phylogeography of *Quercus* Section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation. *Peer J.* 6: e5793.
- 42. Simon L, Rabanal FA, Dubos T. et al. (2018) Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **46**(6): 3019-3033.
- 43. Sun YL, Kang HM, Kim YS, Baek JP, Zheng SL, Xiang JJ, Hong SK. (2014) Tomato (*Solanum lycopersicum*) variety discrimination and hybridization analysis based on the 5S rRNA region. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **28**(3): 431-437.

- 44. Tynkevich YO, Volkov RA. (2014) Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* **48**(1): 1-6.
- 45. Tynkevich YO, Volkov RA. (2019) 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol. Genet.* **53**(6): 459-466.
- 46. Volkov AR, Panchuk II. (2014) 5S rDNA of *Dactylus glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Bull. Vavilov Soc Genet. Breed. Ukraine.* **12**(1): 3-11.
- 47. Volkov RA, Borisjuk NV, Panchuk II, Schweizer D, Hemleben V. (1999) Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana* tabacum. *Mol. Biol. Evol.* 16(3): 311-320.
- 48. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV, Hosiawa-Baranska M, Maluszynska J, Hemleben V. (2017) Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* **17**: 21.
- 49. Volkov RA, Zanke C, Panchuk II, Hemleben V. (2001) Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 1273-1282.
- 50. Wang X, Bennetzen JL. (2015) Current status and prospects for the study of *Nicotiana* genomics, genetics, and nicotine biosynthesis genes. *Mol. Genet. Genomics.* 290(1): 11-21.
- 51. Wilf P, Carvalho MR, Gandolfo MA, Cúneo NR. (2017) Eocene lantern fruits from Gondwanan Patagonia and the early origins of Solanaceae. *Science*. 355(6320): 71-75.

# МОЛЕКУЛЯРНЕ РІЗНОМАНІТТЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ У ФІОЛОГЕНЕТИЦІ ТРИБИ РОЕАЕ

# О.О. Іщенко<sup>1</sup>, І.О. Беднарська<sup>2</sup>, І.І. Панчук<sup>1</sup>, В.А. Кунах<sup>3</sup>, Р.А. Волков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

<sup>2</sup> Інститут екології Карпат, Національна академія наук України, вул. Козельницька, 4, м. Львів, 79026, Україна

<sup>3</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України вул. Академіка Заболотного, 150, м. Київ, 03143, Україна

E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Систематика Злакових (Poaceae), однієї з найбільших та економічно найважливіших родин покритонасінних, дотепер дискусійна й недостатньо розроблена. За відсутності універсальних критеріїв для розмежування таксонів різного рангу, питання обсягів підродин, триб та окремих родів багато в чому лишаються відкритими. Подальший прогрес у цих дослідженнях передбачає залучення додаткових молекулярних маркерів. Зокрема, перспективним видається ширше використання в молекулярній таксономії еволюційно мінливих спейсерних ділянок, які входять до складу 5S рДНК. Щоб перевірити це, нами проаналізовано послідовності 5S рДНК 20 видів триби Роеае, найбільшої в цій родині Злакових. Установлено, що види родів Festuca та Lolium утворюють на філодендрограмі монофілетичну групу з високою статистичною підтримкою, що підтверджує гіпотезу їх походження від спільного предка. Виявлено суттєву відмінність 5S рДНК Avenella flexuosa та виду роду Deschampsia, що свідчить на користь виділення Avenella flexuosa в окремий рід. Отже, отримані нами дані доводять, що, завдяки високій швидкості молекулярної еволюції, порівняльний аналіз спейсерних ділянок 5S рДНК доцільно використовувати для реконструкції філогенезу в межах триби Роеае.

### ВСТУП

Однією з найбільших родин покритонасінних рослин є родина Злакові (Роасеае, порядок Poales – Nakai, 1930), до якої належать такі економічно важливі культури, як пшениця (*Triticum aestivum*), кукурудза (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*) та ін. Ця родина налічує приблизно 12 000 видів, які групуються у 780 родів, що робить її п'ятою за кількістю видів родиною серед Покритонасінних рослин (Christenhusz, Byng, 2016). Антуан Лоран де Жуссьє виділив цю групу рослин під назвою Gramineae в 1789 році, а назва Роасеае запропонована в 1895 році Барнгартом (Takhtajan, 1966). З позицій ботанічної номенклатури, обидві ці назви рівноцінні та можуть використовуватися як альтернативні.

Незважаючи на численні дослідження, на сьогодні не вдалося створити єдиної класифікації злакових рослин та встановити філогенетичні зв'язки, які б не викликали питань або суперечностей. Вважається, що систематика родини Роасеае ускладнена через високу морфологічну подібність видів, зумовлену, зокрема. численними випадками паралельної еволюції та конвергенції (Soreng et al., 2007; Tkach et al., 2019). Тому для отримання об'єктивної картини спорідненості таксонів злаків дослідниками дедалі частіше застосовуються молекулярні методи (Catalán et al., 2004; Catalán et al., 2007; Soreng et al., 2015; Cheng et al., 2016; Hyun et al., 2020; Bednarskaya et al. 2014; Bednarska et al. 2017). Зокрема, значного прогресу у філогенетиці родини Роасеае порівняльному послідовностей досягнуто завдяки вивченню хлоропластної ДНК (Quintanar et al., 2007; Givnish et al., 2010; Saarela et al., 2010).

Важливий внесок у розуміння еволюції злаків зробило міжнародне товариство Grass Phylogeny Working Group (GPWG), основною метою якого є дослідження філогенії родини Poaceae шляхом аналізу послідовностей ДНК пластидних та ядерних генів, а також морфології рослин. Показано, що протягом еволюції від спільного предка послідовно відділилися три невеликі підродини –

Anomochlooideae, Pharoideae та Puelioideae, кожна з яких містить лише по два роди. Решта видів злаків розподіляються між двома великими кладами – PACCAD (Panicoideae, Arundinoideae, Chloridoideae, Micrairoideae, Aristidoideae, Danthonioideae) та BOP (Bambusoideae, Oryzoideae, Pooideae) (Grass Phylogeny Working Group II, 2012; Janke et al., 2013; Soreng et al., 2015).

Отже, таксономічну позицію окремих груп злаків високого рангу натепер з'ясовано. Проте, філогенетичні зв'язки в межах окремих підродин, триб та родів Злакових все ще залишаються дослідженими фрагментарно і потребують подальшого вивчення. Для успішного виконання цього завдання необхідне використання не тільки хлоропластних, але й ядерних маркерів, які володіють порівняно високою еволюційною мінливістю. Серед таких, одними з найбільш інформативних, вважаються повторювані послідовності, які кодують рибосомні РНК (рДНК) – 35S (45S) та 5S рДНК (Volkov et al., 2003).

Аналіз літератури свідчить, що завдяки своїй універсальній будові та наявності у геномах всіх еукаріотичних організмів, 5S рДНК – зручна модель для вивчення молекулярної еволюції та таксономії. Наразі молекулярна організація та еволюція 5S рДНК досліджені у кількох групах Покритонасінних рослин (Тинкевич та ін., 2015; Шелифіст та ін., 2018; Tynkevich, Volkov, 2014; Volkov et al., 2017; Ishchenko et al., 2018). Однак, 5S рДНК все ще використовується недостатньо порівняно з такими молекулярними маркерами, як ділянки пластидного геному або ITS 35S рДНК. Виходячи з цього, вирішено оцінити потенціал використання IGS 5S рДНК у молекулярній таксономії триби Роеае, яка налічує близько 2800 видів і є найбільшою у родині Poaceae (Soreng et al., сиквенували IGS Festuca fallax, вперше 2017). Для цього представника одного з найбільших родів триби Роеае, та здійснили порівняльний аналіз послідовностей IGS 19 інших представників розшифрованих раніше нами (Volkov, Panchuk, цієї триби, 2014; Іщенко та ін., 2018а; Іщенко, Панчук, 2018б; Ishchenko et al., 2018; Іщенко, Волков, 2020; Ishchenko et al., 2020; Ishchenko et al. 2021) та іншими дослідниками (Röser et al., 2001; Peng et al., 2008).

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження був гербаризований зразок костриці обманливої, *Festuca fallax*, зібраний в урочище Жандарми біля г. Близниця, Свидовецький хребет, Рахівський район, Закарпатська область. Загальну ДНК ізолювали згідно зі стандартною методикою (Porebski et al., 1997).

Ампліфікацію повторюваної ділянки 5S рДНК за допомогою ПЛР та її подальше клонування проводили, як описано нами раніше (Ishchenko et al., 2021). Отримані клони сиквенували на фірмі LGC Genomics (Німеччина).

Для аналізу повногеномних архівів, наявних у базі даних Genbank, використовували такі етапи: (1) пошук в базі даних Sequence Read Archive (SRA), яка містить послідовності геномів, сиквенованих методом Illumina; (2) ідентифікація послідовностей 5S рДНК; (3) аналіз повногеномного архіву за допомогою програми SeqMan NGen 14; (4) первинна обробка отриманих послідовностей.

Полінуклеотидні послідовності аналізували за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакета програм DNASTAR. Вирівнювання послідовностей виконували методом MAFFT E. Філогенетичну дендрограму будували за допомогою онлайн-сервісу IQTREE (Trifinopoulos et al., 2016).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації 5S рДНК *Festuca fallax* показало, що для дослідженого зразка утворюється лише один ПЛР-продукт довжиною близько 350 нп. Це свідчить, що у костриці обманливої повтори 5S рДНК однорідні за довжиною в межах геному.

Два клони 5S рДНК *Festuca fallax* сиквеновано. Аналіз отриманих послідовностей показав, що обидві рекомбінантні вставки складаються з послідовності IGS, яка оточена з двох боків фрагментами кодувальної ділянки включно з праймерами, використаними для клонування. Встановлено, що довжина IGS у двох досліджених клонах становить 197 та 198 нп (табл. 1).

MUNA ON T WHIMMON T	VNJ vzapanu	DITUTIVI INITATI	IIUUUIVAVIUUI	11111 1 httvir 1	ocac
	Y	Слон	Ι	GS	
Назва виду	Назва	GenBank Acc. No	Довжина, нп	Bмicт GC пар, %	Посилання
<i>Avena clauda</i> Durieu	Avcla	DQ823492.1	169	48.52	Peng et al., 2008
Avena macrostachya Balansa ex Coss. et	Avmac1	AJ390215.1	172	54,65	Röser et al., 2001
Dulleu (Hencion Icnon macrostachyum (Balansa et Durieu) Henrard)	Avmac2	EF064638.1	186	53,23	Peng et al., 2008
Avena sativa L.	Avsat	AJ390231.1	176	50.57	Röser et al., 2001
	Anfle1	MT335693	173	55,49	
Avenella flexuosa (L.) Parl	Anfle4	MT335694	173	54,91	
(Lerchenfeldia flexuosa L.;	Anfle7	MT335695	176	56,82	Ishchenko et al., 2020
Descriampsia Jiexuosa (L.) 11111.)	Anfle8	MT335696	190	53,68	
	Anfle9	MT335697	176	56,82	
Dactulis alomerata I	Daglo1	KF743553	140	53,57	Volkov, Panchuk,
Ducifies Beomestatu D.	Daglo3	KF743555.1	140	53,57	2014
-	DeantA1.1	MH071970	661	55,28	
<i>Deschampsta</i> <i>antarctica</i> E. Desv.	DeantA1.11	MH071971	204	53,43	Ishchenko et al., 2018
	DeantA8.5	MH071972	197	54,59	

Таблиня 1 (початок). Характеристика клонів представників триби Роеае
I AUJINIT KINDUUGAR	сння). Ларак	теристика клон	IB IIDCALIA	ыныы трич	N LUCAC
	K	ЛОН	I	GS	
Назва виду	Назва	GenBank Acc. No	Довжина, нп	Bміст GC пар, %	Посилання
	DeantA8.10	MH071973	203	54,90	Ichohomico of c1 2018
Deschampsia antarctica E. Desv. (продовження)	DeantA10.11	MH071974	203	54,19	
	DeantA10.13	MN519101	211	53,55	Ishchenko et al., 2020
Rostnea carnatica F. Dietr	Fecar2	MT514528	197	52,79	Ichchanko at al 2021
roman and an anna i	Fecar5	MT514529	197	52,28	12012 11 11 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 1
Eastnea fallar Thuill	Fefal5		197	54,31	الم محمومة
r comen junur 1 mmm.	Fefal9		198	52,53	דלא בזמווש
Fostura anina I	Feovi13	MT514530	197	48,73	Ichchanko at al 2021
I COINCH OVING L.	Feovi23	MT514531	197	49,75	131101101100 01 al., 2021
Helictochloa aetolica (Rech. f.) Romero Zarco (Helictotrichon aetolicum (Rech. f.) Holub)	Hcaet	AJ390137.1	185	55.68	Röser et al., 2001
Helictochloa bromoides (Gouan) Romero Zarco (Helictotrichon bromoides (Gouan) C.E. Hubb)	Hcbro	AJ390158.1	187	54,01	Röser et al., 2001
Helictochloa pratensis (L.) Romero Zarco (Helictotrichon pratense (L.) Pilg.; Avena pratensis L.)	Hcpra	AJ390197.1	187	53.48	Röser et al., 2001

итопів пиетотавциків тийи Роезе 0711 Таблина 1(пподовження). Хапактепист

TAUTURA I AUTURATION I	1HNJ. Mapanic	PHULINKA NJUHIB	IIPCAULABE		locac
	Y	Слон	Ī	GS	
Назва виду	Назва	GenBank Acc. No	Довжина, нп	Bміст GC пар, %	Посилання
<i>Helictotrichon convolutum</i> (C. Presl) Henrard	Htcon	AJ390078.1	178	56,74	Röser et al., 2001
Lagurus ovatus L.	Laova	AJ390222.1	173	51.45	Röser et al., 2001
I olinin moron milo I	Loper4	MT335698	189	47,62	Imanwo ra in 20186
roumu per enne r.	Loper7	MT335699	188	46,81	100 IG 10. 70100
Phalaris coerulescens Desf.	Phcoe	Y09573.1	188	48,94	X. Li, unpublished
Dhloum mustance I	Phpra1	MT335700	208	52,88	Immun m in 2010.
rnieum praiense L.	Phpra3	MT335701	209	53,11	ищенко та ин., 2010а
	Popra12		182	53,30	
	Popra_Rep1		185	52,97	
rou pratensis L.	Popra_Rep2	SRX 5824432*	183	53,55	шснко та ін., 2020
	Popra_Rep3		185	52,97	
Tricholemma jahandiezii (Litard. ex Jahand. & Maire) Röser (Helictotrichon jahandiezii (Litard. ex Jahand. & Maire) Potztal; Avena jahandiezii Litard. ex Jahand. & Maire)	Tcjah	AJ390218.1	173	50.29	Röser et al.,2001
Trisetum spicatum (L.) K. Richt.	Tsspi	AJ390233.1	175	56,00	Röser et al.,2001

Послідовності 5S рДНК *Festuca fallax* було порівняно з IGS інших видів триби Роеае, отриманими нами або іншими дослідниками раніше (табл. 1). Встановлено, що довжина IGS та вміст GC-пар у досліджуваних видів коливається від 169 до 211 нп та від 46,81 до 56,74 % відповідно.

Рівень подібності IGS у видів з різних родів триби Роеае, переважно, лежить у межах 48,3-91,1 %. Водночас між видами, які належать до одного роду, рівень подібності IGS складає 73,8-87,1 %. Послідовності IGS різних видів/родів відрізняються не тільки замінами нуклеотидів, але й кількома інделами (рис. 1).

Порівняльний аналіз послідовностей IGS дозволив виявити відносно консервативні елементи, ймовірно задіяні у транскрипції 5S рДНК. Зокрема, на початку IGS знаходиться оліго-dT мотив, який, вірогідно, бере участь у термінації транскрипції. Консенсусна послідовність цієї ділянки – TCCTTTTTGC, але у різних видів, особливо у *Phalaris coerulescens* та *Tricholemma jahandiezii*, ця ділянка дещо відрізняється (рис. 2).

Раніше показано, що в Arabidopsis thaliana до елементів зовнішнього промотора Pol III належать АТ-багатий мотив TATATA, динуклеотид GC нуклеотид С, розташовані, та відповідно, на відстані -28, -13 та -1 перед початком кодувальної ділянки (Cloix et al., 2000; Simon et al., 2018). У всіх порівнюваних видів триби Роеае у позиції –29 виявлено консервативний мотив ATAA, за винятком Dactylis glomerata, в якого у цьому мотиві виявлено одну трансверсію: АТАТ (рис. 3). Динуклеотид GC знайдений у всіх досліджуваних видів, проте у різних позиціях або двічі. Наприклад, у Lagurus ovatus, Avenella flexuosa, навіть Deschampsia antarctica, Dactylis glomerata, Avena macrostachya, Festuca fallax, GC знайдено у позиціях -16 та -12 від початку кодувальної ділянки. У решти видів цей динуклеотид зустрічається один раз у різних позиціях -12, -14 чи -16 (рис. 3). Нуклеотид С знайдено в позиції –1 у всіх досліджуваних видів.

Consensus		-40	-0		120	140 160	180	200	220 H	240	260 2	271 ■
Avcla												
4vmac1												₽
4vmac2		and a second sec										
Avsat												
Avfle1												
Avfle7												
Daglo1												100
Daglo3												F
DeantA1.1												85
DeantA1.11												
DeantA8.10	T											
DeantA8.5												
DeantA10.11												
DeantA10.13												
Fecar2												
Fecar5												
Fefal5			4100000									
Fefal9			and the second s									
Feovi13												1
Feovi23												
Hcaet												
Hcbro												P
Hcpra												
Hcon												
-aova												
-oper4												
_oper7												
Phone												
Phpra1												
Phpra3			and the second s									
Popra_Rep1												8
Popra12												
<b>Tcjah</b>												
Isspi												
	шитемеч	goc en	L BIIIE/IEG	BITTEGOTIGORIO					NGC NGC		лнк	e
			humun	VIIIINGAIIIGIdiga	n y n					2		,
представни	аків три	би Poe	ıe. Характє	ристики вико	риста]	них для пс	орівняння	нопл н	ів подан	HO Y T2	абл. 1.	

Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: 🗔 – менше 60 %,

-100%

- 80-100 %,

- 60-80 %,

Avcla Avmac1 Avmac1 Avmac1 Avfie1 Avfie7 Avfie7 Avfie7 Daglo1 DeantA1.1 DeantA1.1 DeantA1.1 DeantA10. Fecar5 Fefal9 Fecar13 Fecar2 Fecar2 Fecar2 Fecar2 Fecar2 Fecar2 Fecar3 Fecar13 Fecar2 Fecar3 Fec Consensu

		10	20	30	40	50	60	70	80
Majority	TCCXXXXX	XXXTTTTTG	CGTCACGCG	ACGACGXXX	XXXXXXXXXX	+	SXXXXXXXX	CGTGXGCACGGTCG	
Avmacl		····		ч				ATG	
Avmac2	T		GC	TT				ACC	ł
Avsat	T		T.	G				AC	ł
Anfle1		·····						T.CTGG.ACGTAP	AG
Anfle7		·····		····g···				T.GTGGCGTAP	AG
Daglol									
Dean+21 1		L							
DeantA1 11							A	A	U
DeantA10 11			.TT.				AA	A AC	GA
DeantA10 13	c						AA	cc	ł
DeantA8 10	A	·····	.T.T				AA	A	99
DeantA8 5	A		.T.T				AA	A	99
Fecar2			c	HE			TD	.ATGAAT	1
Fecar5			c.	G			TD	.ATGAAT	1
Fefa15		· · · · · · · · · · · ·	A	GC			TD	CTGAAT	1
Fefa19	T	······································	Α	GC			TD		ł
Feovi13		·····	CTTTT	AC			TD	.ACTGAATA-	1
Feovi23		·····	CTTTT	AC			19	.ACGAATA-	ł
Hcaet		· · · · · · · · · ·	.cT				AA	.CCTAP	AT
Hcbro		· · · · · · · · · · · ·					AA	.CCTAZ	AT
Hcpra		·····					AA	.CCTAP	AT
Htcon	A	·····						A.CT	ł
Laova	T	· · · · · · · · · · ·		A.AA				ACT-	ł
Loper4	TC	·····		GA			エエーーーーーー	.ATGAATA-	ł
Loper7	T		A	GA			TT	TGAATA-	ł
Phcoe	TTTTTA	TTT.	GAC				CA	A.AG	ł
Phpral	C-T	·····	TA	TCT.	TAATTTTTTT	CGCGAAACGG	GACGACGG.	T AAI	AA
Phpra3	CTT	· · · · · · · · · · ·	A	TCT	<b>PCATTTTTTC</b>	CGCGAAACGA	GACGACGG.	AA	AA
Popra_Rep1			c					GA-	-
Popra12		·····	c.	·····				CGA-	1
Tcjah	L. TTTTT-	A		.ACG.C				G.A.CTA	1
Tsspi		TTTLALLE.	•				• • • • • • • • • •	····-	ŀ
Рис. 2. Структ	турна орг	анізація ді	лянки тер	мінації тр	анскрипції	5S pµHK 1	представн	иків триби Роеа	le.

На сірому фоні вказано розташування оліго-dT послідовностей

	250	260	270	280	290
	+			+	
Majority	GAXAGGAGCCGGA	GXGGGCAAGCA	TAAXGGGAAAA	ACGGCGTGC	ACAACATGTC
Avcla	TT	. –	G.CATCT	C [	A
Avmac1	TT	T.GTG	G.		.G
Avmac2	TT	. –	TACCCO	C	.G
Avsat	T.G.ATAA.A	ACGG.	TG.T		.A
Anfle1	AT	G.	· · · ·  - · · · · · · (	C <b></b>	.T
Anfle7	AT	. –	· · ·  - · · · · · ·	· / T	.T
Daglo1		. –		CTCTC	.GA.
Daglo3		. –	TTC	CTOTC	.GT.
DeantA1_1		r	cc(	GTC	.A
DeantA1_11	–	G.	cc(	стс	
DeantA10_11		G.	cc	сто	G
DeantA10_13	T.S	rg	CT	.TQ.T	.T
DeantA8_10		G.	cc(	СТС	
DeantA8_5		G.	cc(	стс	
Fecar2	TC.TG	. –	C	A	
Fecar5	TC.T	. –	A		
Fefal5	CGC	C	C	••••	
Fefal9	CGC.C	c	C		
Feovil3	T.CA	c	C		
Feovi23	T.CA	c	C	ca	
Hcaet	TTC	c		G.C.A	.G
Hcbro	TC	c	· · ·  - · · · · · ·	G.C.A	.G
Hcpra	TTC	c		G.C.A	.G
Htcon	TGT	. –	G		.G
Laova	TGTAA.	r	AG.G		.GT
Loper4	CAG	A	· · ·  - · · · · · ·	.T.A	.T
Loper7	CAG	A		.T. <mark>A</mark>	.т
Phcoe	CG	CG	T	. AAT	.T.CA.
Phpra1		. –	· · ·  - · · · · · ·	<mark>.</mark> G	T
Phpra3		. –		••••	T
Popra_Rep1		A		G	
Popra12	TGAATT.G	A		<b>.</b> G	
Tcjah	TT	A	G.	A	.G
Tsspi	T.GT	.–G.			.G

**Рис. 3.** Вирівнювання нуклеотидних послідовностей ділянки ініціації транскрипції 5S рДНК представників триби Роеае. На сірому фоні представлені передбачувані зовнішні елементи промотору

На основі вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS побудована філодендрограма, на якій досліджувані види розподілилися між п'ятьма основними кладами, які мають високу статистичну підтримку (рис. 4).





Найбільша на дендрограмі клада FL, яка об'єднує види родів *Festuca* L. (костриця) та *Lolium* L. (пажитниця). В межах клади FL три досліджені види Костриць утворюють окрему підгрупу, тоді як *Lolium perenne* є сестринським таксоном по відношенню до неї. Аналіз отриманих нами послідовностей 5S рДНК показав, що довжина IGS для всіх клонів *Festuca* становить 197-198 нп, а у *Lolium perenne* ця ділянка дещо коротша, 188-189 нп (табл. 1). Між трьома видами *Festuca* подібність IGS становить від 81,9 до 86,3%, при порівнянні з *Lolium perenne* цей показник коливається від 67,2 до 72,3%. Послідовності IGS цих видів (рис. 5) високоподібні в межах геномів, натомість для кожного з видів характерні специфічні точкові мутації (рис. 5).

Представники роду Festuca поширені в усіх позатропічних країнах обох півкуль, а також у гірських районах тропіків. Більшість із них є домінантами або співдомінантами різноманітних – від рівнинних до субальпійських фітоценозів лук, від широколистяних лісів до остепнених лук і кам'янистих осипищ (Clayton, Renvoize, 1986; Catalán et al., 2004; Беднарська, 2007; Yamada, 2011). Серед видів роду широко представлені як диплоїдні, так і поліплоїдні форми, походження яких вимагає істотного прояснення (Humphreys et al., 1995; Kopecký et al., 2006; Šmarda, Stančík, 2006; Kopecký et al., 2008; Hand et al., 2010; Hand et al., 2013). Деякі види роду Festuca (F. pratensis, F. arundinacea) та Lolium (L. multiflorum та L. perenne) є основними кормовими травами, широко культивованими в усьому світі (Thomas et al., 2003; Kopecký et al., 2008). На сьогодні, завдяки великому практичному значенню, ці види Festuca та Lolium є найкраще досліджені серед усіх незернових злаків. Проте генетичний потенціал багатьох інших видів Festuca все ще залишається недостатньо використаним, хоча деякі з них перспективнимі для селекції та цінні в практичному відношенні (Thomas et al., 2003; Yamada, 2011; Braun et al., 2020). Подальший прогрес у цьому питанні потребує кращих знань про генетичну спорідненість видів.

151

	10	20	30	40	50
Majority	TCCT-TTTT-GCGT	CACACGGCGA	CCGTCATGGT	GAATTCGGGGG	GATAA
Fecar2 Fecar5 Feovi13 Feovi23 Fefal5 Fefal9 Loper7 Loper4		CT TTTTA.A. TTTTA.A.	.GC GCC GC GA .ATG	A.T. A.C. G.TAA.	A .GT .GT .C
	60	70	80	90	100
Majority Fecar2 Fecar5 Feovi13 Feovi23 Fefa15 Fefa19 Loper7 Loper4	TTTTTTTACGGCCCC ACT.C ACT.T. C. C. GG.A	CTCGTGCTCG	GCTTTTGGTG CC .CC .CT.A A	ATCGTAAAAACG G G G G G G G G G G A G A.	GTGGT
	110	120	130	140	150
Majority Fecar2 Fecar5 Feovi13 Feovi23 Fefa15 Fefa19 Loper7 Loper4	GCGCATGGTAAAGT TG TG TG TTCG G.A.AAA GAAA	GGCATGGGCA	ГGGTAAAATC .C .C .C	GTCCGTTTTGC A.A.A.A.A. TC.A.A.A.A.A. TC.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A	CAAGAC T G G C
	160	170	180	190	
Majority Fecar2 Fecar5 Feovi13 Feovi23 Fefal5 Fefal9	AAGTAGCCGGAGGG .CG .CCAC. CAC. GCC	GCAAGCATAA	GGCAAAACGA .AC. .CG	CGTGCACAACA	ATGTC
Loper7	GC.CC. AGGA	•••••	GT		

**Рис. 5.** Структурна організація IGS 5S рДНК *Festuca carpatica, Festuca ovina, Festuca fallax* та *Lolium perenne* 

Протягом останніх трьох століть таксономія роду Festuca залишається предметом дискусій. Linnaeus (1753) наводить лише сім видів роду Festuca, п'ять з яких пізніше перенесено до роду Bromus. Згодом описано багато нових видів, і наприкінці XIX ст. Hackel (1882) запропонував розділити рід Festuca на шість секцій. Відтоді таксономія роду Festuca зазнавала численних ревізій – від прийняття роду в широкому розумінні (Цвелев, 1976; Markgraf-Dannenberg, 1980) до виділення з його меж окремих самостійних родів Drymochloa Holub, Schedonorus Beauv. Ta Leucopoa Griseb. (Soreng, Terrell, 1998; Holub, 1998). Пізніше, використовуючи порівняння ділянок trnL-F хпДНК та ITS1-2 було отримано нові уявлення про філогенію підтриби Loliinae (Gaut et al., 2000; Torrecilla, Catalán, 2002; Catalán et al., 2004; Inda et al., 2014; Cheng et al., 2016). Зокрема, встановлено, що ця підтриба є парафілетичним комплексом, який можна розділити на дві основні лінії, а саме: (і) «вузьколисті» таксони, до яких належать більшість видів роду Festuca з низкою інших родів (наприклад, Vulpia, Hellerochloa та ін.) та (ii) «широколисті» Серед останніх таксони. виявлено близьку спорідненість роду Lolium та «широколистих» видів Festuca, які належать до підроду Schedonorus. Отримані результати цілком узгоджується з думкою про високу спорідненість родів Festuca та Lolium і показують, що порівняльний аналіз IGS 5S рДНК може бути успішно використаний для детального з'ясування філогенетичних відносин у підтрибі Loliinae.

Клада D охоплює шість клонів IGS *Deschampsia antarctica*, отриманих нами раніше. Ці клони представляють три структурні класи 5S рДНК, які суттєво відрізняються за послідовністю IGS (Ishchenko et al., 2018; Ishchenko et al., 2020). До класу 1 належать клони DeantA1.11, DeantA8.5, DeantA8.10 та DeantA10.11, класу 2 – DeantA1.1 і класу 3 – DeantA10.13. Рівень подібності IGS чотирьох наведених на дендрограмі клонів класу 1 знаходиться в межах від 92,6 до 98,9%. Водночас, між IGS різних структурних класів цей показник значно менший і коливається від 79,3 до 85,2%. Загалом,

наявні дані вказують на суттєву внутрішньогеномну дивергенцію IGS у *Deschampsia antarctica*. Цікаво, що у преважної більшості досліджених представників триби Poeae (за винятком *Avena macrostachya* – див. рис. 1) повтори 5S рДНК демонструють набагато більшу подібність в межах одного геному. Що стосується *Avena macrostachya*, то ймовірною причиною суттєвої різниці двох наведених на дендрограмі клонів може бути алотетраплоїдне походження цього виду (Baum, Rajhathy, 1976). Відповідно, два варіанти 5S рДНК можуть походити від двох батьківських диплоїдів. Аналогічно, наявність у геномі *Deschampsia antarctica* трьох класів 5S рДНК може бути вказівкою на алоплоїдне походження цього виду (див. нижче).

Для щучника звивистого Avenella flexuosa нами досліджено п'ять клонів 5S рДНК (див. табл. 1), в яких рівень подібності IGS знаходиться у межах від 81,2 до 94,8%. Порівняльний аналіз розшифрованих послідовностей свідчить, що в геномі Avenella flexuosa присутні як мінімум два структурні класи повторів 5S рДНК. До першого класу можна віднести клони Anfle1, Anfle4 та Anfle8, а до другого – Anfle7 та Anfle9.

На отриманій нами дендрограмі Avenella flexuosa групується окремо від роду Deschampsia. Варто нагадати, що таксономічний статус Avenella flexuosa є предметом дискусії протягом двох століть. Цей вид згадується під назвою Aira flexuosa L. ще у першому виданні Species Plantarum (Linnaeus, 1753). У першій половині XIX ст., з огляду на морфологічну подібність, щучник звивистий включено до роду Deschampsia P. Beauv. (Palisot de Beauvois, 1812) під назвою Deschampsia flexuosa (L.) Trin., 1836. Ця назва широко використовується до сьогодні у багатьох каталогах та флорах, хоча деякі ботаніки пропонували виділити щучник звивистий в окремий монотипний рід Avenella (A. flexuosa (L.) Drejer, 1838) або Lerchenfeldia (L. flexuosa (L.) Schur, 1866) (Chiapella, 2007; Chiapella, Zuloaga, 2010).

Пізніше, спираючись на дослідження морфології та анатомії листків, коренів та колосків, а також будови хромосом, Albers також вважав, що щучник звивистий має бути виділений в окремий рід *Avenella* (Albers, 1972a; Albers 1972b; Albers 1980). Проте ця точка зору не була визнана більшістю ботаніків.

Avenella flexuosa має хромосомне число x = 14, що відрізняє цей вид від представників роду Deschampsia – D. antarctica, D. danthonioides, D. elongata, D. cespitosa, D. parvula та *D. sukatschewii*, у яких x = 13. З огляду на те, що переважна більшість споріднених видів секції Роеае мають х = 7, можна вважати, що внаслідок еволюції родів Avenella та Deschampsia відбулося подвоєння набору хромосом, яке у роді Deschampsia (на відміну від Avenella) супроводжувалося втратою одної хромосомної пари (Cardone et al., 2009; Parnikoza et al., 2011). Останнім часом будова хромосом Deschampsia була також досліджена методами молекулярної цитогенетики, які виявили суттєву різницю між Avenella flexuosa та кількома представниками роду Deschampsia (Amosova et al., 2017; Navrotska et al., 2018).

3 появою молекулярних маркерів для прояснення таксономічного статусу Avenella flexuosa використано послідовності пластидного гену trnL та ядерної ділянки ITS1-2 (Garcia-Suarez et al., 1997; Souto et al., 2006; Chiapella, 2007; Chiapella, Zuloaga, 2010). Отримані результати показали, що щучник звивистий має бути виключений з роду Deschampsia і виділений в окремий рід. Водночас автори підкреслюють, що порівняння послідовностей ITS1-2 дозволяє отримати лише перше уявлення про філогенію роду Deschampsia та споріднених таксонів, оскільки ця ділянка геному не достатньою роздільною здатністю (Chiapella, володіє 2007). З огляду на широке розповсюдження сітчастої еволюції у трибі Роеае, для прояснення філогенії та дослідження можливого гібридного походження ряду таксонів вочевидь необхідно залучити більше ядерних маркерів (Chiapella, 2007; Soreng et al., 2007). Зручним інструментом для цього виявляється 5S рДНК.

155

Клади ALT, Av та H охоплюють види роду Avena та споріднених родів, філогенетичні відносини між якими є предметом тривалих дискусій (Röser et al., 2001; Peng et al., 2008; Romero-Zarco, 2011). Клада H охоплює види роду Helictochloa – H. aetolica, H. bromoides та H. pratensis. Порівняння послідовностей IGS показує високий рівень подібності – від 94,1 до 95,5% (рис. 6), що доводить високу спорідненість цих видів.

	10	20	30	40	50
Majority Hcaet Hcbro	CTCCTGGGAAGTCC	TCGTGTTGCA	ICCCTCCTTT	TTGCCTCACGC	CGACGA
Hcpra		•••••	• • • • • • • • • • • •	•••••	•••••
	60	70	80	90	100
Majority Hcaet Hcbro	CGACCTGCGCACGG	TTAATCGGGC(	CGTTATATAT: GT.	TTTTTGTGCGC	GCCGCT
Hcpra	•••••		G		
	110	120	130	140	150
Majority Hcaet Hcbro Hcpra	CGTGCTCGCCGTTT	GTGCGTGGTA .CG C.	AACTCGGGXXX	КТТТТĠААСGO С	GTXXAA 
	160	170	180	190	200
Majority Hcaet Hcbro Hcpra	ATTCGTGCGTAGGC	ACGAGAATGA	GCTCGAGGGC	CAAGCATAAGO	GAAAA
	210	220	230	240	250
Majority Hcaet Hcbro Hcpra	CGGGGCGAAGAACA	TXTCGGATGC( .T .A	GATCATACCA	GCACTAAAGC	ACCGGA

**Рис. 6.** Структурна організація IGS 5S рДНК *Helictochloa bromoides*, *H. aetolica* та *H. pratensis* 

Клада ALT включає в себе представників трьох родів – Avena sativa, Lagurus ovatus та Trisetum spicatum. Таке групування відповідає таксономії, побудованій за пластидними генами, де ці роди відносять до підтриби Aveninae (Soreng et al., 2015). Принагідно зазначимо, що Avena sativa знаходиться окремо і не групується з іншими дослідженими представниками цього роду.

Клада Av включає в себе Avena clauda та один із клонів Avena macrostachya, Avmac2. Інший клон цього виду, Avmac1, суттєво відрізняється від нього за нуклеотидною послідовністю (74,2 % подібності) та займає на дендрограмі ізольоване положення. Отже, отримані результати свідчать, що таксономія роду Avena все ще потребує додаткового вивчення.

## ВИСНОВКИ

Порівняльний аналіз послідовностей IGS 5S рДНК представників різних родів триби Роеае свідчить, що молекулярна еволюція цієї ділянки геному відбувалася за рахунок нуклеотидних замін та інделів. Потенційні зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III, наявні у IGS 5S рДНК, відрізняються від таких в інших родинах дводольних рослин.

Зважаючи на відносно високу швидкість молекулярної еволюції, порівняльний аналіз IGS доцільно використовувати для реконструкції філогенезу в межах триби Роеае.

За послідовністю IGS та розташуванням на філодендрограмі Deschampsia antarctica та Avenela flexuosa суттєво відрізняються між собою, що підтверджує правомірність виключення останнього виду зі складу роду Deschampsia.

# СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 1. Беднарська IO. (2007) Рід *Festuca* L. (Роасеае) у флорі західних регіонів України : дис. канд. : 03.00.05. Київ, 2007.
- 2. Іщенко ОО, Деревенко ТО, Панчук II. (2018a) 5S rDNA of Timothy-grass *Phleum pratense* L. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*. **10**(2): 107-112.

- 3. Іщенко ОО, Панчук II. (2018б) Молекулярна організація 5S рДНК пажитниці багаторічної *Lolium perenne* L. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. **16**(2): 166-173.
- 4. Іщенко ОО, Волков РА. (2020) Організація 5S рибосомної ДНК *Роа pratensis* L. *Науковий вісник Чернівецького університету*. *Біологія (Біологічні системи)*. **12** (2): 135-140.
- 5. Тинкевич ЮО, Невельська АО, Чорней II, Волков РА. (2015) Організація та мінливість міжгенного спейсера 5S рДНК *Lathyrus venetus. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* **13**(1): 81-87.
- 6. Цвелев НН. (1976) Род Festuca L. Злаки СССР. Л.: Наука.
- 7. Шелифіст АЄ, Тинкевич ЮО, Волков РА. (2018) Молекулярна організація 5S рДНК *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *Bicн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* **16**(1): 61-68.
- Albers F. (1972a) Cytotaxonomie und B-Chromosomen bei Deschampsia cespitosa (L.) P.B. und verwandten Arten. Beitr. Biol. Pflanzen. 48: 1-62.
- 9. Albers F. (1972b) Cytosystematische Untersuchungen in der Subtribus Deschampsiineae Holub (Tribus Aveneae Nees). II. Die Gattungen Vahlodea Fr. und Avenella Koch. Ber. Deutsch Bot. Ges. 85: 279-285.
- 10. Albers F. (1980) Vergleichende Karyologie der Gräser-Subtriben Aristaveninae und Airinae (Poaceae-Aveneae). *Plant Syst. Evol.* 136(3/4): 137-167.
- Amosova AV, Bolsheva NL, Zoshchuk SA, Twardovska MO, Yurkevich OYu, Andreev IO, Samatadze TE, Badaeva ED, Kunakh VA, Muravenko OV. (2017) Comparative molecular cytogenetic characterization of seven *Deschampsia* (Poaceae) species. *PLoS One*. 12(4): e0138878.
- 12. Baum BR, Rajhathy T. (1976) A study of *Avena macrostachya*. *Can. J. Bot.* **54**(21): 2434-2439.
- Bednarskaya IA, Popov VN, Dugar YuN, Akinina GE, Dolgova TA. (2014) ISSR analysis of some species of angustifoliate fescue. *Cytol. Genet.* 48(6): 25-32.

- Bednarska I, Kostikov I, Tarieiev A, Stukonis V. (2017) Morphological, karyological and molecular characteristics of *Festuca arietina* Klok. – a neglected psammophilous species of the *Festuca valesiaca* agg. from Eastern Europe. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 59(1): 35-53.
- 15. Braun RC, Patton AJ, Watkins E, Koch P, Anderson NP, Bonos SA, Brilman LA. (2020) Fine fescues: A review of the species, their improvement, production, establishment, and management. *Crop Sci.* 60(3): 1142–1187.
- 16. Cardone S, Sawatani P, Rush P, García AM, Poggio L, Schrauf G. (2009) Karyological studies in *Deschampsia antarctica* Desv.(Poaceae). *Polar Biol.* 32(3): 427-433.
- 17. Catalán P, Torrecilla P, López Rodríguez JA, Olmstead RG. (2004) Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe *Loliinae* and allies (Poeae, Pooideae) inferred from ITS and trnL–F sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* **31**(2): 517-541.
- 18. Catalán P, Torrecilla P, López-Rodríguez JA, Müller J, Stace CA. (2007) A systematic approach to subtribe Loliinae (Poaceae: Pooideae) based on phylogenetic evidence. *Aliso* 23(1): 380-405.
- 19. Cheng Y, Zhou K, Humphreys MW, Harper JA, Ma X, Zhang X, Huang L. (2016) Phylogenetic relationships in the *Festuca-Lolium* complex (Loliinae; Poaceae): new insights from chloroplast sequences. *Fron. Ecol. Evol.* **4**: 89.
- 20. Chiapella J, Zuloaga FO. (2010) A Revision of *Deschampsia*, *Avenella*, and *Vahlodea* (Poaceae, Poeae, Airinae) in South America. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **97**(2): 141-162.
- 21. Chiapella J. (2007) A molecular phylogenetic study of *Deschampsia* (Poaceae: Aveneae) inferred from nuclear ITS and plastid trnL sequence data: support for the recognition of *Avenella* and *Vahlodea*. *Taxon*. **56**(1): 55-64.
- 22. Christenhusz MJM, Byng JW. (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*. **261**(3): 201-217.
- 23. Clayton WD, Renvoize SA. (1986) Genera graminum. Grasses of the world. *Kew Bull. Additional Series XIII*: 1-389.

- 24. Cloix C, Tutois S, Mathieu O, Cuvillier C, Espagno MC, Picard C, Tourmente S. (2000) Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genome Res.* **10**(5): 679-690.
- 25. Garcia-Suarez R, Alonso-Blanco C, Fernandez-Carvajal MC, Fernandez-Prieto JA, Roca A, Giraldez R. (1997) Diversity and systematics of *Deschampsia* sensu lato (Poaceae), inferred from karyotypes, protein electrophoresis, total genomic DNA hybridization and chloroplast DNA analysis. *Plant Syst. Evol.* **205**(1/2): 99-110.
- 26.Gaut BS, Tredway LP, Kubik C, Gaut RL, Meyer W. (2000) Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of the *Festuca-Lolium* complex (Poaceae) based on ITS sequence data. *Pant Syst. Evol.* **224**(1/2): 33-53.
- 27. Givnish TJ, Ames M, McNeal JR, McKain MR, Steele PR, de Pamphilis CW, Graham SW, Pires JC, Stevenson DW, Zomlefer WB, Briggs BG, Duvall MR, Moore MJ, Heaney JM, Soltis DE, Soltis PS, Thiele K, Leebens-Mack JH (2010) Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. *Ann. Miss. Bot. Gard.* **97**(4): 584-616.
- 28. Grass Phylogeny Working Group II. (2012) New grass phylogeny resolves deep evolutionary relationships and discovers C4 origins. *New Phytologist.* **193**(2): 304–312.
- 29. Hackel E. (1882) *Monographia Festucarum Europaeum*. Fischer: Kassel and Berlin.
- 30. Hand ML, Cogan NO, Stewart AV, Forster JW. (2010) Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetics of the *Lolium-Festuca* species complex. *BMC Evol. Biol.* **10**(1): 303.
- 31. Hand ML, Spangenberg GC, Forster JW, Cogan NO. (2013) Plastome sequence determination and comparative analysis for members of the *Lolium-Festuca* grass species complex. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 3(4): 607-616.
- 32.Holub J. (1998) Reclassifications and new names in vascular plants. *Preslia*. **70**(1): 97-122.

- 33. Humphreys MW, Thomas HM, Morgan WG, Meredith MR, Harper JA, Thomas H, Zwierzykowski Z, Ghesquiére M (1995) Discriminating the ancestral progenitors of hexaploid *Festuca arundinacea* using genomic *in situ* hybridization. *Heredity*. **75**(2): 171-174.
- 34. Hyun DY, Sebastin R, Lee KJ, Lee GA, Shin MJ, Kim SH, Lee JR, Cho GT. (2020) Genotyping-by-sequencing derived single nucleotide polymorphisms provide the first well-resolved phylogeny for the genus *Triticum* (Poaceae). *Front. Plant Sci.* **11**: 688.
- 35. Inda LA, Sanmartín I, Buerki S, Catalán P. (2014) Mediterranean origin and Miocene–Holocene Old World diversification of meadow fescues and ryegrasses (*Festuca* subgenus *Schedonorus* and *Lolium*). *J. Biogeogr.* **41**(3): 600-614.
- 36. Ishchenko OO, Panchuk II, Andreev IO, Kunakh VA, Volkov RA.
  (2018) Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschapmpsia antarctica*. *Cytol. Genet.* 52(6): 416-421.
- 37. Ishchenko OO, Mel'nyk VM, Parnikoza IY, Budzhak VV, Panchuk II, Kunach VA, Volkov RA. (2020) Molecular organization of 5S ribosomal DNA and taxonomic status of *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (Poaceae). *Cytol. Genet.* 54(6): 505-513.
- 38. Ishchenko OO, Bednarska IO, Panchuk II. (2021) Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytol. Genet.* **55**(1): 10-18.
- 39. Janke A, Zhao L, Zhang N, Ma PF, Liu Q, Li DZh, Guo ZhH. (2013) Phylogenomic Analyses of Nuclear Genes Reveal the Evolutionary Relationships within the BEP Clade and the Evidence of Positive Selection in Poaceae. *PLoS One*. 8(5): e64642.
- 40. Kopecký D, Loureiro J, Zwierzykowski Z, Ghesquière M, Doležel J. (2006) Genome constitution and evolution in *Lolium* × *Festuca* hybrid cultivars (*Festulolium*). *Theor. Appl. Genet.* **113**(4): 731–742.
- 41.Kopecký D, Lukaszewski AJ, Doležel J. (2008) Cytogenetics of *festulolium (Festuca× Lolium* hybrids). *Cytogenet. Genome Res.* 120(3-4): 370-383.
- 42. Linnaeus C. (1753) Impensis Laurentii Salvii. Species Plantarum. Holmiae.

- 43. Markgraf-Dannenberg I. (1980) *Festuca L. Flora Europaea*. Cambridge, Univ. Press.
- 44. Nakai T. (1930) Notulæ ad Plantas Japoniæ & Koreæ XXXIX. Shokubutsugaku Zasshi. 44(526): 507-537.
- 45. Navrotska D, Andreev I, Betekhtin A, Rojek M, Parnikoza I, Myryuta G, Szymanowska-Pułka J, Grakhov V, Ivannikov R, Hasterok R, Kunakh V. (2018) Assessment of the molecular cytogenetic, morphometric and biochemical parameters of *Deschampsia antarctica* from its southern range limit in maritime Antarctic. *Pol. Polar Res.* **39**(4): 525-548.
- 46.Palisot de Beauvois AMFJ. (1812) Essai d'une nouvelle Agrostographie; ou nouveau genres des Graminées; avec figures représentant les caracters de tous les genres. Paris: Chez l'auteur, Rue de Turenne.
- 47. Parnikoza I, Kozeretska I, Kunakh V. (2011) Vascular plants of the Maritime Antarctic: origin and adaptation. *Am. J. Plant Sci.* 2(3): 381-395.
- 48. Peng YY, Wei YM, Baum BR, Zheng YL (2008) Molecular diversity of the 5S rRNA gene and genomic relationships in the genus Avena (Poaceae: Aveneae). Genome. **51**(2):137-54.
- 49. Porebski S, Bailey LG, Baum BR. (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* **15**(1): 8-15.
- 50. Quintanar A, Castroviejo S, Catalán P. (2007) Phylogeny of the tribe Aveneae (Pooideae, Poaceae) inferred from plastid trnT-F and nuclear ITS sequences. Amer J Bot. 94(9): 1554-1569.
- 51. Romero-Zarco C. (2011) *Helictochloa* Romero Zarco (Poaceae), a new genus of oat grass. *Candollea*. **66**(1): 87-103.
- 52.Röser M, Winterfeld G, Grebenstein B, Hemleben V. (2001) Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae). *Mol. Phylogen. Evol.* 21(2): 198-217.

- 53. Saarela JM, Liu Q, Peterson PM, Soreng RJ, Paszko B. (2010) *Phylogenetics of the grass' Aveneae-type plastid DNA clade' (Poaceae: Pooideae, Poeae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequence data. Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledons.* Aarhus: Aarhus University Press.
- 54. Simon L, Rabanal FA, Dubos T, Oliver C, Lauber D, Poulet A, Vogt A, Mandlbauer A, Le Goff S, Sommer A, Duborjal H, Tatout C, Probst AV. (2018) Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl Acids Res.* 46(6): 301-3033.
- 55.Šmarda P, Stančík D. (2006) Ploidy level variability in South American fescues (*Festuca* L., Poaceae): use of flow cytometry in up to 5 <sup>1</sup>/<sub>2</sub> -year-old caryopses and herbarium specimens. *Plant Biol.* 8(1): 73-80.
- 56. Soreng RJ, Terrell EE. (1998) Taxonomic Notes on *Schedonorus*, a Segregate Genus from *Festuca* Or *Lolium*, with a New Nothogenus, *x Schedololium*, and New Combinations. *Phytologia*. **83**(2): 84-86.
- 57. Soreng RJ, Davis JI, Voionmaa MA. (2007) A phylogenetic analysis of Poaceae tribe *Poeae* sensu lato based on morphological characters and sequence data from three plastid-encoded genes: evidence for reticulation, and a new classification for the tribe. *Kew Bulletin*. 62(3): 425-454.
- 58. Soreng, RJ, Peterson PM, Romaschenko K, Davidse G, Zuloaga FO, Judziewicz EJ, Filgueiras TS, Davis JI, Morrone O. (2015) A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). J. Syst. Evol. 53(2): 117-137.
- 59. Soreng RJ, Peterson PM, Romaschenko K, Davidse G, Teisher JK, Clark LG, Barberá P, Gillespie LJ, Zuloaga FO. (2017) A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. *J. Syst. Evol.* **55**(4): 259-290.
- 60. Souto DPF, Catalano SA, Tosto D, Bernasconi P, Sala A, Wagner M, Corach D. (2006) Phylogenetic relationships of *Deschampsia antarctica* (Poaceae): insights from nuclear ribosomal ITS. *Plant Syst. Evol.* **261**(1): 1-9.

- 61. Takhtajan AL (1966) System and phylogeny of flowering plants. «Nauka», Leningrad.
- 62. Thomas HM, Morgan WG, Humphreys MW. (2003) Designing grasses with a future-combining the attributes of *Lolium* and *Festuca*. *Euphytica*. **133**(1): 19-26.
- 63. Tkach N, Schneider J, Döring E, Wölk A, Hochbach A, Nissen J, Winterfeld G, Meyer S, Gabriel J, Hoffmann MH, Röser M. (2019) Phylogeny, morphology and the role of hybridization as driving force of evolution in grass tribes Aveneae and Poeae (Poaceae). *bioRvix* 707588.
- 64. Torrecilla P, Catalán P. (2002) Phylogeny of broad-leaved and fineleaved *Festuca* lineages (Poaceae) based on nuclear ITS sequences. *Syst. Bot.* **27**(2): 241-251.
- 65. Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44(W1): W232-W235.
- 66. Tynkevich YO, Volkov RA. (2014) Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* **48**(1): 3-9.
- 67. Volkov AR, Panchuk II. (2014) 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine.* **12**(1): 3-11.
- 68. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk LG, Borisjuk MV. (2003) Plant rDNA: Organization, evolution, and use. *Cytol Genet.* **37**(1): 68-72.
- 69. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV, Hosiawa-Baranska M, Maluszynska J, Hemleben V. (2017) Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* **17**(1): 1-15.
- 70. Yamada T. (2011) *Festuca*. In: Kole C. (eds) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, Springer, Berlin Heidelberg.

# **3MICT**

ВСТУП
ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ У ФІЛОГЕНЕТИЦІ РОСЛИН
О.О. Іщенко, Р.А. Волков 5
ЗАСТОСУВАННЯ 5S рДНК ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СТРУКТУРИ КУЛЬТУРНИХ ФОРМ <i>CYDONIA OBLONGA</i> MILL.
Ю.О. Тинкевич, Т.О. Деревенко, Р.А. Волков
ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ЕВОЛЮЦІЯ IGS 5S рДНК ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ <i>ROSA</i>
Ю.О. Тинкевич, Р.А. Волков 47
МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК У ТАКСОНОМІЇ РОДУ <i>LATHYRUS</i>
Ю.О. Тинкевич, І.І. Чорней, Р.А. Волков
5S РИБОСОМНА ДНК ВІДДАЛЕНИХ ВИДІВ РОДУ <i>QUERCUS</i> : МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ТАКСОНОМІЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ
Ю.О. Тинкевич, К.Д. Бушила, Р.А. Волков 81
МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ МІЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА 5S рДНК ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ <i>GENTIANA</i> L.
I.О. Андрєєв, В.М. Мельник, Г.Ю. Мирюта, А.Є. Шелифіст, P.А. Волков, В.А. Кунах 105

5S РИБОСОМНА ДНК ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ SOLANACEAE	
Ю.О. Тинкевич, А.Є. Шелифіст, Р.А. Волков 1	23
МОЛЕКУЛЯРНЕ РІЗНОМАНІТТЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ В ДОСЛІДЖЕННІ ФІОЛОГЕНІЇ ТРИБИ РОЕАЕ	
О.О. Іщенко, І.О. Беднарська, І.І. Панчук, В.А. Кунах,	
Р.А. Волков 1	39

#### ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

- Андрєєв Ігор Олегович канд. біол. наук, провідний науковий співробітник відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, м. Київ.
- Беднарська Ірина Олександрівна канд. біол. наук, старший науковий співробітник відділу охорони природних екосистем Інституту екології Карпат Національної академії наук України, м. Львів.
- Бушила Крістіна Дмитрівна аспірант кафедри молекулярної генетики та біотехнології Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича, м. Чернівці.
- Волков Роман Анатолійович доктор біол. наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України, завідувач кафедри молекулярної генетики та біотехнології Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича, м. Чернівці.
- Деревенко Тетяна Олександрівна канд. біол. наук, директор Ботанічного саду Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича, м. Чернівці.
- Іщенко Ольга Олегівна доктор філософії з біології, асистент кафедри молекулярної генетики та біотехнології Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича, м. Чернівці.
- Кунах Віктор Анатолійович член-кореспондент Національної академії наук України, доктор біол. наук, професор, завідувач відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, м. Київ.
- **Мельник Віталій Миколайович** канд. біол. наук, старший науковий співробітник відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.
- **Мирюта Ганна Юріївна** науковий співробітник відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.
- Панчук Ірина Ігорівна доктор біол. наук, професор, професор кафедри молекулярної генетики та біотехнології Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича, м. Чернівці.
- **Тинкевич Юрій Олегович** канд. біол. наук, старший науковий співробітник кафедри молекулярної генетики та біотехнології Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича, м. Чернівці.
- **Чорней Ілля Ілліч** доктор біол. наук, професор, завідувач кафедри ботаніки, лісового та садово-паркового господарства Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича, м. Чернівці.
- Шелифіст Антоніна Євгенівна канд. біол. наук, доцент, доцент кафедри молекулярної генетики та біотехнології Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича, м. Чернівці.

Наукове видання

## 5S рибосомна ДНК квіткових рослин Монографія

За редакцією Р.А. Волкова

Відповідальна за випуск Шелифіст А.Є. Літературний редактор Лупул О.В. Технічний редактор Чораєва Г.К. Дизайн обкладинки Панчук І.І.,Тинкевич Ю.О.

Підписано до друку 20.12.2021. Формат 60х84/16. Папір офсетний. Друк різографічний. Умов.-друк. арк. 9,2. Обл.-вид. арк. 9,9. Тираж 50. Зам. 1011. Видавництво та друкарня Чернівецького національного університету. 58012, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2. e-mail: <u>ruta@chnu.edu.ua</u>

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 891 від 08.04.2002.

















