

УДК 577.212:582.734.4

СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК *ROSA NITIDA* WILLD.

Ю.О. ТИНКЕВИЧ, Р.А. ВОЛКОВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: ra.volkov@gmail.com

З метою вивчення молекулярної організації ділянки геному, що кодує 5S рРНК диплоїдного виду *Rosa nitida* було клоновано та сиквеновано декілька повторюваних одиниць 5S рДНК. Аналіз отриманих послідовностей виявив наявність у геномі повторюваних одиниць 5S рДНК двох типів. Довжина повторів мажорного і мінорного типів складає 506–514 п.н. та 318 п.н., відповідно. Різниця в довжині пов'язана з делецією частини міжгенної спейсерної ділянки (МГС). Повтори 5S рДНК обох типів містять у МГС інтактні елементи промотора та імовірно є транскрипційно активними.

Ключові слова: *Rosa*, 5S рДНК, молекулярна еволюція, видоутворення у рослин.

Вступ. Використання у таксономічних дослідженнях методів молекулярної генетики дозволило значною мірою переглянути існуючу систему вищих рослин. Зокрема, ревізії зазнали таксономії родового та підродового рангів. Прикладами успішного застосування молекулярних підходів у таксономії можуть бути дослідження таких великих і складних у систематичному відношенні родів, як *Prunus* L. та *Solanum* L. [1–6].

Використання технік AFLP, RAPD, SSR та аналіз нуклеотидних послідовностей хлоропластних генів та спейсерних ділянок 35S рибосомальної ДНК дозволили значною мірою вдосконалити і таксономію роду *Rosa* L. [7–10]. Проте походження алополіплоїдних видів та особливості молекулярної еволюції унікальних та повторюваних послідовностей у їхніх геномах (особливо у зв'язку з перманентною непарною поліплоїдією у *Rosa canina*) все ще залишаються нез'ясованими.

Ділянки геному, які кодують рРНК, зокрема 5S рДНК, широко використовуються у дослідженнях із молекулярної еволюції та таксономії [4, 5, 11, 12]. Це пов'язано із особливостями структурної організації та еволюції цих генів. Гени 5S рДНК належать до класу тандемних повторюваних послідовностей, тобто мають кластерний тип організації. Кластери можуть бути локалізовані на одній чи декількох хромосомах. Кількість повторюваних одиниць на один кластер зазвичай складає від кількох десятків до тисяч [13]. Кожна повторювана ділянка в межах кластеру складається з високо консервативної кодуючої послідовності та варіабельного міжгенного спейсера (МГС). У вищих рослин більша частина МГС не транскрибується та не несе важливої для регуляції транскрипції інформації. Внаслідок цього, більшість мутацій, що виникають у МГС мають нейтральний характер і тому не зазнають дії природного добору. Накопичення таких мутацій призводить до високої швидкості еволюції МГС порівняно із кодуючими ділянками.

© Ю.О. ТИНКЕВИЧ, Р.А. ВОЛКОВ, 2011

ми. Швидкі еволюційні зміни дозволяють «побачити» різницю у послідовності МГС не лише у представників різних родів, а й близько споріднених видів [4, 11].

Вважається, що рДНК, як і інші повторювані послідовності, еволюціонує концертно (узгоджено) [14]. Явище концертної еволюції полягає у здатності до вирівнювання різниці (гомогенізації) всіх послідовностей як у межах одного кластера, так і між різними кластерами. Концертна еволюція є можливою навіть при просторовій ізоляції локусів рДНК, за рахунок міжлокусної конверсії. Проте результати багатьох досліджень показують, що гомогенізація 5S рДНК, особливо між послідовностями з різних кластерів, не завжди проходить ефективно. Ця властивість еволюції 5S рДНК є корисною при визначенні геномів батьківських форм алополіплоїдних видів, оскільки батьківські варіанти 5S рДНК залишаються майже незмінними в геномі алоплоїда [15].

Зважаючи на вищезазначене, 5S рДНК є ефективним молекулярним маркером для дослідження таксонів алополіплоїдного генезу. Одним із таких таксонів є рід *Rosa* L., для якого характерна значна кількість поліплоїдних видів гібридогенного походження. Вважається, що у процесі гібридизації вступала значна кількість диплоїдних видів роду. Тому, першим кроком на шляху до розуміння генетичної структури алополіплоїдів, має бути вивчення можливих диплоїдних предкових форм. Відповідно, метою даної роботи було клонування, розшифровка та аналіз первинної нуклеотидної послідовності МГС 5S рДНК одного з диплоїдних видів – *Rosa nitida* Willd.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження був зразок *Rosa nitida* з колекції ботанічного саду м. Тюбінген (Німеччина). Загальну ДНК екстрагували з гербаризованого листа згідно стандартного протоколу з використанням цетавлону як детергенту [16].

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням пари праймерів 5S–14a-Not (5' - CAATGCGGCCGCG AGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC–3') і 5S–15-Not (5' - CATTGCGGCCGCTTATCG GAGTTCTGATGGGA–3'). Нуклеотидна послідовність праймерів є комплементарною до центральної частини кодуєчої ділянки 5S рДНК та універсальною для всіх дводольних рослин. Крім того, праймери містять на 5' -кінці додатковий сайт впізнавання ендонуклеази рестрикції *Not* I (GCGGCCGC), що використовується для клонування ПЛР-продуктів. Місце гібридизації праймерів на матриці ДНК забезпечує ампліфікацію повномірного МГС та фланкуючих ділянок кодуєчої послідовності (рисунок).

Реакційна суміш для ПЛР 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, 0,3 мМ MgCl₂, 1х буфер для ПЛР та 0,5 мкМ кожного з двох праймерів 5S–14a-Not і 5S–15-Not. Загальний об'єм суміші складав 25 мкл. ПЛР проводилась з використанням ампліфікатора MiniCycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95 °С, 15 хв.; (2) денатурація ДНК – 94 °С, 45 с; (3) гібридизація праймерів – 55 °С, 1 хв; (4) синтез ДНК – 72 °С, 2,5 хв; (5) закінчення ампліфікації – 72 °С, 8 хв; (6) припинення реакції – 4 °С. Загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Продукти ПЛР виявляли електрофоретично у 2% агарозному гелі.

Для клонування ПЛР-продукти обробляли ендонуклеазою рестрикції *Not* I після чого лігували по компліментарних липких кінцях у сайт *Eco* 52 плазмиди pLitmus 38і з використанням Т4 ДНК-лігази (Fermentas, Литва). Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL-blue проводили

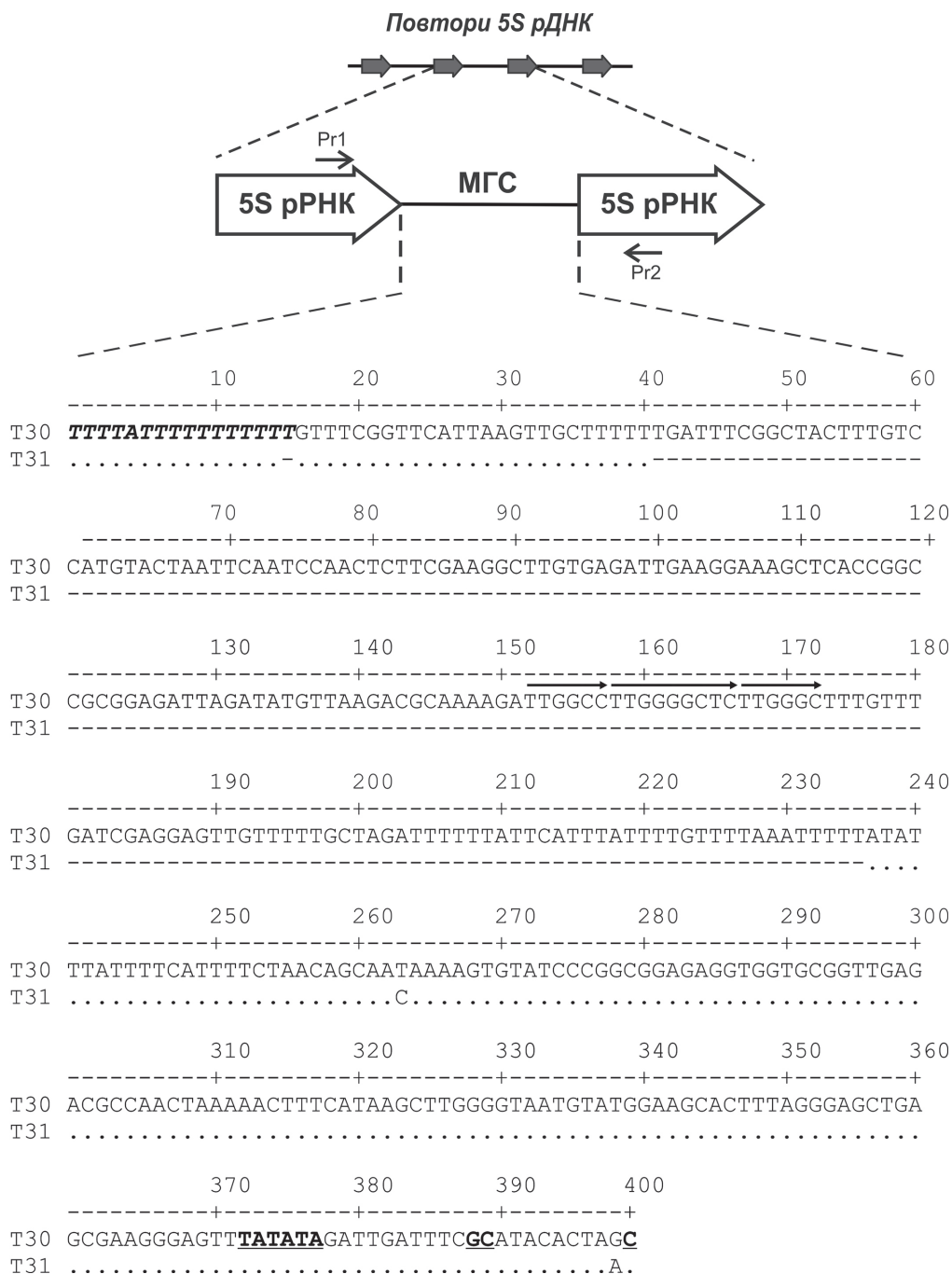


Рисунок. Структурна організація МГС 5S рДНК *Rosa nitida*. Жирним курсивом виділено оліго-Т послідовність термінатора, підкресленим жирним шрифтом позначено елементи зовнішнього промотору. Стрілками позначено окремі субповтори, присутні в центральній частині МГС. Pr1 та Pr2 – праймери 5S-14a-Not та 5S-15-Not, відповідно

ли методом електропорації з використанням приладу *E. coli* Pulser (BioRad, США). Клоні, що містять рекомбінантні плазмідні виявлялися за допомогою методу *blue-white colony selection*. Плазмідні виділяли методом лужного лізису [17]. Наявність інсерції перевіряли за допомогою розщеплення ендонуклеазою рестрикції *Eco* 52. Ферментативні реакції проводили згідно з рекомендаціями фірми-постачальника (Fermentas, Литва).

Рекомбінантні плазмідні, що містили інсерт 5S рДНК сиквенували з використанням Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit на сиквенаторі ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems, США). Первинну обробку отриманої нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR [18]. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Clustal V [19]. Пошук послідовностей у базі даних Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST [20].

Результати та їх обговорення

Аналіз результатів електрофоретичного розділення ПЛР-продуктів показав існування в геномі *R. nitida* двох типів послідовностей 5S рДНК, що істотно відрізнялись за довжиною. Послідовності 5S рДНК мажорного типу ампліфікувалися з утворенням більшої кількості ПЛР-продукту із довжиною повторюваної одиниці в межах 520–540 н.п. Довжина повторів мінорного типу складала 320–340 н.п. Отримані ПЛР-продукти було клоновано у бактеріальний вектор.

За допомогою *blue-white colony selection* було відібрано 10 колоній трансформантів і виділено з них зразки плазмідної ДНК. Розщеплення ендонуклеазою рестрикції *Eco* 52 призводило до появи на електрофореграмі двох смуг, що відповідають фрагментам ДНК різного розміру. Фрагмент більшого розміру для всіх зразків мав довжину приблизно 2800–2900 н.п., що відповідає розміру вектора pLitmus 38. Фрагмент меншого розміру мав довжину приблизно 520 н.п. та 320 н.п., що відповідає розмірам ПЛР-продуктів 5S рДНК *R. nitida*. Загалом, було ідентифіковано сім плазмід зі вставкою, з яких чотири – pRoni-T30, pRoni-T31, pRoni-T32 та pRoni-T33 було відібрано для сиквенування.

Аналіз сиквенованих послідовностей показав, що всі чотири клони містять МГС 5S рДНК фланкований з обох сторін фрагментами кодуючої ділянки. Полілінкерні зони вектора межують із послідовностями використаних для ампліфікації праймерів. Загальну довжину інсертів наведено в табл. 1.

Сумарна довжина фланкуючих МГС фрагментів кодуючої ділянки (включаючи послідовність праймерів 5S–14a-Not, 5S–15-Not) становила 114 н.п. Зважаючи на те, що 6 н.п. центральної частини кодуючої ділянки залишаються неампліфікованими із застосуванням використаних нами праймерів, можна стверджувати, що загальний розмір ділянки, яка кодує 5S рРНК у *R. nitida* складає 120 н.п. Такий розмір є характерним для переважної більшості видів вищих рослин [21]. Послідовність

Таблиця 1. Характеристика сиквенованих повторюваних ділянок 5S рДНК *Rosa nitida*

Назва клону	Довжина інсерту, н.п.	Довжина МГС, н.п.	Характеристика МГС	Вміст А-Т пар, %	
				Кодуюча ділянка	МГС
pRoni-T30	514	400	Повномірний	45,8	62,00
pRoni-T31	318	204	Містить делецію – 196 нп	45,8	61,3
pRoni-T32	506	392	Містить делецію – 8 нп	45,8	61,9
pRoni-T33	514	400	Повномірний	45,8	62,9

нуклеотидів кодуєної ділянки є однаковою в усіх отриманих нами клонів 5S рДНК *R. nitida*. Визначення границь кодуєної ділянки дозволило встановити існування двох різних за розмірами варіантів МГС. Довжина короткого варіанта, що властивий для повторів 5S рДНК мінорного типу складає 204 н.п., тоді як у повторів мажорного типу виявлено МГС довжиною 392 н.п. та 400 н.п. Такі значення довжин МГС відповідають широкому діапазону його розмірів, характерному для вищих рослин: від 200 до 600 н.п. [21]. Раніше нами було показано, що МГС довгого типу зустрічається в 5S рДНК більшості представників роду *Rosa* L., а короткого – лише у декількох видів, зокрема у *R. canina* та деяких інших поліплоїдів [22].

Послідовності кодуєної ділянки і МГС суттєво відрізняються за вмістом А-Т пар (табл. 1). Для МГС цей показник є подібним у всіх чотирьох клонів і значно нижчим, ніж для кодуєної ділянки.

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей інсертів методом Clustal V показало, що рівень подібності між повторами 5S рДНК мажорного типу є дуже високим і коливається від 98,8 % до 99,6 % (табл. 2). Послідовність інсертів мінорного типу рRoni-T31 при порівнянні з іншими клонами характеризується відсотком подібності від 94,0 % до 96,2 %. Послідовності рRoni-T30 та рRoni-T33 відрізняються між собою лише двома транзиціями в межах МГС. МГС клону рRoni-T32 не містить нуклеотидних замін, проте несе на 5' кінці восьминуклеотидну делецію. Найбільш відмінним був клон рRoni-T31, що представляє мінорний тип 5S рДНК повторів. У межах МГС послідовності рRoni-T31 виявлено дві транзиції на 3' кінці, одонуклеотидну делецію на 5' кінці та велику 196 нуклеотидну делецію, яка і обумовлює невеликі розміри повторів мінорного типу (рисунок).

У проаналізованих послідовностях МГС *R. nitida* виявлено сигнали характерні для

Таблиця 2. Рівень подібності (%) МГС 5S рДНК *Rosa nitida*

Клони	рRoni-T30	рRoni-T31	рRoni-T32	рRoni-T33
рRoni-T30	–	96,2	98,8	99,6
рRoni-T31	–	–	94,0	96,2
рRoni-T32	–	–	–	98,8
рRoni-T33	–	–	–	–

зовнішнього промотора 5S рДНК [23]. До таких регуляторних послідовностей належить мотив ТАТАТА, розташований на 3' кінці МГС в позиції –28 нп від 5' кінця кодуєної ділянки, а також мотиви GC та C в позиціях –12 та –1, відповідно (рисунок). Також безпосередньо після 3' кінця кодуєної ділянки локалізована полі-Т послідовність, що імовірно виконує функцію термінатора транскрипції [23].

Значну частину нуклеотидної послідовності МГС проаналізованих клонів складають короткі 1–4 нуклеотидні негомогенні повтори. У середній частині МГС (позиція –237) присутня ділянка, що складається з трьох субповторів, довжина яких коливається від шести до дев'яти н.п. (рисунок). В клоні рRoni-T31 ці субповтори відсутні разом з центральною частиною МГС.

Проведений аналіз показав невелику кількість мутацій в МГС трьох досліджених клонів *R. nitida*, що свідчить про існування процесів гомогенізації тандемних повторів 5S рДНК і, відповідно, концертний характер їхньої еволюції [14]. При цьому, наявність значної делеції в МГС повторів мінорного типу можна пояснити локалізацією послідовностей двох типів у різних кластерах, що зазвичай обмежує гомогенізацію [15]. Встановлена ідентичність нуклеотидної послідовності кодуєної ділянки для всіх досліджених повторів 5S рДНК *R. nitida* узгоджується з уявленнями про низьку швидкість її молекулярної еволюції [14, 21, 24]. Разом із наявністю в МГС непорушених елементів зовнішнього промотору ці особливості вказують на те, що дослідженні

клони мажорного типу ймовірно є транскрипційно активними послідовностями 5S рДНК. Багатонуклеотидна делеція властива послідовностям мінорного типу може вказувати на переродження їх у псевдогени [25]. Проте непошкодженість транскрипційно-важливих елементів (рисунок) не дозволяє стверджувати це однозначно і залишає відкритим питання про функціональну активність повторів обох типів. Додатковим аргументом на користь такої можливості слід вважати те, що короткі повтори мінорного типу не були втрачені в процесі еволюції, оскільки вони присутні в геномах кількох поліплоїдних видів [22].

Висновки

Досліджено структурну організацію 5S рДНК повторюваних одиниць диплоїдного виду *Rosa nitida* Willd. Виявлено 2 типи тандемних повторів: мажорний, із довжиною 506–514 н.п. та мінорний – 318 н.п. Наявність послідовностей 5S рДНК мінорного типу можна розглядати як вказівку на генетичну спорідненість дослідженого виду до деяких поліплоїдних представників роду (зокрема *R. canina* L.), які мають мінорні повтори 5S рДНК довжиною близько 320 н.п. Виявлений високий рівень гомології окремих повторів у межах мажорного типу МГС вказує на ефективність процесів гомогенізації та свідчить, що послідовності 5S рДНК в геномі *R. nitida* еволюціонують концертно. При цьому, існування значної делеції в МГС повторів мінорного типу може пояснюватись локалізацією послідовностей двох типів у різних кластерах, що обмежує їхню гомогенізацію. Обидва типи повторів мають неушкоджену кодуючу ділянку та необхідні регуляторні послідовності у МГС і, відповідно, можуть бути транскрипційно активними.

Перелік літератури

1. Панчук І.І. Организация повторяющихся последовательностей в подсемействе *Prunoidea* в связи с видообразованием: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Минск, 1992. – 25 с.
2. Lee S, Wen J. A phylogenetic analysis of *Prunus* and the *Amygdaloideae* (Rosaceae) using its sequences of nuclear ribosomal DNA // *Am. J. Bot.* – 2001. – Vol. 88. – P. 150–160.
3. Wen J, Berggren S.T., Lee C.H., Ickert-Bond S., Ting-Shuang Y.L., Yoo K.O., Xie L., Shaw J., Potter D. Phylogenetic inferences in *Prunus* (Rosaceae) using chloroplast *ndhF* and nuclear ribosomal ITS sequences // *J. Syst. Evol.* – 2008. – Vol. 46. – P. 322–332.
4. Volkov R.A., Zanke C., Panchuk I.I., Hemleben V. Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding // *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – Vol. 103. – P. 1273–1282.
5. Volkov R.A., Komarova N.Y., Panchuk I.I., Hemleben V. Molecular evolution of rDNA external transcribed spacer and phylogeny of sect. *Petota* (genus *Solanum*). // *Mol. Phyl. Evol.* – 2003. – Vol. 29. – P. 187–202.
6. Komarova N.Y., Grimm G.W., Hemleben V., Volkov R.A. Molecular evolution of 35S rDNA and taxonomic status of *Lycopersicon* within *Solanum* sect. *Petota* // *Plant Syst. Evol.* – 2007. – Vol. 276. – P. 59–71.
7. Wisseman V. The genus *Rosa* (Rosaceae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atpB-rbcL* intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy // *Bot. J. Linn. Soc.* – 2005. – Vol. 147. – P. 275–290.
8. Nybom H., Esselink G., Werlemark G. Leus L., Vosman B. Unique genomic configuration revealed by microsatellite DNA in polyploid dogroses, *Rosa* sect. *Caninae* // *Eur. Soc. Evol. Biol.* – 2005. – Vol. 19. – P. 635–648.
9. De Cock K. Genetic diversity of the wild Roses (*Rosa* spp.) in Europe, with an in-depth morphological study of Flemish populations // PhD Thesis, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University. – 2008. – 295 p.
10. Jürgens A.H., Seitz B., Kowarik I. Genetic differentiation of *R. canina* L. at regional and continental scales // *Plant Syst. Evol.* – 2007. – Vol. 269. – P. 39–53.
11. Denk T., Grimm G. The oaks of western Eurasia: Traditional classifications and evidence from two nuclear markers // *Taxon.* – 2010. – Vol. 59. – P. 351–366.
12. Poczai P., Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and

- prospects // Mol. Biol. Rep. – 2010. – Vol. 37. – P. 1897–1912.
13. Cloix C., Tutois S., Mathieu O., Cuvillier C., Espagnol M.C., Picard G., Tourmente S. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms // Genome Res. – 2000. – Vol. 10. – P. 679–690.
 14. Coen E.S., Thoday J.M., Dover G. Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster* // Nature. – 1982. – Vol. 295. – P. 564–568.
 15. Fulnecek J., Lim K.Y., Leitch A.R., Kovarik A., Matyasek R. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species // Heredity. – 2002. – Vol. 88. – P. 19–25.
 16. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. – 1985. – Vol. 5. – P. 69–76.
 17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии – М.: Мир, 1984. – 479 с.
 18. DNASTAR, 1998. MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
 19. Higgins D.G. Bleasby A.J. Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment // Bioinformatics. – 1992. – Vol. 8. – P. 189–191.
 20. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. – 1997. – Vol. 25. – P. 3389–3402.
 21. Singh D., Ahuja P.S. 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification // Genome. – 2006. – Vol. 49. – P. 91–96.
 22. Тинкевич Ю.О., Сербенюк М.П., Волков Р.А. Поліморфізм 5S рДНК видів роду *Rosa* L. // Наук. вісник Чернівецького ун-ту – № 455, Сер. Біологія. – Чернівці: «Рута». – 2009. – С. 142–144.
 23. Douet J., Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis* // Heredity. – 2007. – Vol. 99. – P. 5–13.
 24. Suzuki H., Moriwaki K., Sakura S. Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs // Mol. Biol. Evol. – 1994. – Vol. 11. – P. 704–710.
 25. Takahata N., Kimura M. A model of evolutionary base substitutions and its application with special reference to rapid change of pseudogenes // Genetics. – 1981. – Vol. 98. – P. 641–657.

Представлено І.О. Андрєєвим
Надійшла 6. 10. 2011

СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК *ROSA NITIDA* WILLD.

Ю.О. Тинкевич, Р.А. Волков

Черновицький національний університет імені Юрія Федьковича,
Україна, 58012, г. Черновці, ул. Коцюбинського, 2
e-mail: ra.volkov@gmail.com

Для вивчення молекулярної організації участка генома, який кодує 5S рРНК у диплоїдного виду *Rosa nitida* було клонировано і сиквеніровано декілька повторюючихся одиниць 5S рДНК. Аналіз отриманих послідовностей показав наявність в геномі двох типів повторюючихся одиниць 5S рДНК. Довжина повторів мажорного і мінорного типів становить 506–514 п.н. і 318 п.н., відповідно. Різниця в довжині пов'язана з делецією частини міжгенного спейсерного участка (МГС). Повтори 5S рДНК обох типів містять в МГС інтактні елементи промотора і, ймовірно, являються транскрипційно активними.

Ключові слова: *Rosa*, 5S рДНК, молекулярна еволюція, видообрання у рослин.

STRUCTURAL ORGANIZATION OF 5S RIBOSOMAL DNA OF *ROSA NITIDA* WILLD.

Yu. O. Tynkevych, R. A. Volkov

Yurii Fedkovych University of Chernivtsi
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynski str. 2
e-mail: ra.volkov@gmail.com

In order to clarify molecular organization of the genomic region encoding 5S rRNA in diploid *Rosa nitida* species several 5S rDNA repeated units were cloned and sequenced. Analysis of the obtained sequences revealed two types of 5S rDNA repeated units present in the genome. The repeat lengths for major and minor types account for 506–514 bp and 318 bp, respectively. The length difference may be due to deletion some of the intergenic spacer region (IGS). The 5S rDNA repeats of both types contain intact promoter elements in the IGS and appear to be transcriptionally active.

Key words: *Rosa*, 5S rDNA, molecular evolution, plant speciation.