

УДК 577.113.5:582.542.11

МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ 5S рДНК ПАЖИТНИЦІ БАГАТОРІЧНОЇ *LOLIUM PERENNE* L.

О. О. ІЩЕНКО, І. І. ПАНЧУК

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

Мета. Рибосомальна ДНК (рДНК) є важливим інструментом молекулярної систематики та являє собою зручну модель для вивчення еволюції повторюваних послідовностей. Проте, для багатьох груп покритонасінних рослин 5S рДНК все ще залишається вивченою недостатньо, зокрема для такої великої групи як родина Тонконогові або Злакові. Відповідно, було вирішено проаналізувати молекулярну організацію 5S рДНК у широко розповсюдженого та економічно важливого виду *Lolium perenne*. **Методи.** Виділення ДНК, ПЛР-ампліфікація, клонування та розшифрування нуклеотидної послідовності ДНК. **Результати.** Сиквенуюано дві клоновані послідовності 5S рДНК *L. perenne*. Показано, що в геномі *L. perenne* присутній тільки один варіант повторюваної одиниці 5S рДНК з міжгенним спейсером (МГС) довжиною 188–189 нп. У МГС виявлено потенційні елементи промотора та термінатора РНК-полімерази III. Рівень подібності МГС представників різних родів триби *Poaceae* коливається від 46 до 63 %. **Висновки.** Порівняльний аналіз МГС може бути використаний для уточнення філогенетичних відносин між таксонами низького рангу, зокрема — між видами та родами триби *Poaceae*.

Ключові слова: 5S рДНК, міжгенний спейсер, молекулярна еволюція, *Lolium*, *Poaceae*.

Вступ. Родина Тонконогові (*Poaceae*) або Злакові (*Gramineae*), яка налічує більш, ніж 11 000 видів і домінує у більшості наземних екосистем, є однією з найбільших екологічно та економічно важливих родин покритонасінних рослин (Clayton et al., 2014; Duvall et al. 2009; Soreng et al., 2015). Незважаючи на важливість цієї родини, єдиної думки щодо її філогенії та систематики досі не існує. Однією з причин цього є висока морфологічна подібність злаків, що вимагає широкого застосування молекулярних методів для вирішення відкритих питань її систематики.

Значний прогрес у філогенетиці родини *Poaceae* було досягнуто завдяки порівняльному вивченню хлоропластної ДНК (Clayton et al., 2014; Givnish et al., 2010; Quintanar et al., 2007). Пізніше шляхом порівняння хлДНК та морфологічних ознак було проаналізовано більше семисот родів та створено сучасну класифікацію родини (Soreng et al., 2015). Проте, в багатьох випадках хлДНК є недостатньо мінливою для використання у систематиці таксонів низького рангу. Відповідно, постає питання пошуку інших, більш мінливих ділянок геному.

В останні десятиліття в молекулярній систематиці широко використовують 45S рДНК, тоді як 5S рДНК все ще залишається менш дослідженою в цьому плані (Bolsheva et al., 2017; Denk, Grimm, 2010; Grimm et al., 2005; Quintanar et al., 2007; Volkov et al., 2001; Volkov et al., 2010; Zeng et al., 2015). 5S рДНК належать до середньоповторюваних тандемно організованих послідовностей. До складу повторюваної одиниці (повтору) 5S рДНК входить ділянка, яка кодує 5S рРНК та міжгенний спейсер (МГС). Кодувальна ділянка є еволюційно консервативною, і помітні відмінності в її послідовності спостерігаються лише при порівнянні віддалених таксонів.

Натомість, послідовність МГС швидко накопичує мутації і нерідко значно відрізняється вже на міжвидовому або навіть міжпопуляційному рівні (Пусак та ін., 2016; Baum et al., 2012; Mlinarec et al., 2016; Saini, Jawali, 2009; Volkov et al., 2001; Volkov et al., 2003).

На сьогодні для триби Poae, яка є найбільшою у родині і охоплює 118 родів та близько 2800 видів (Soreng et al., 2015), 5S рДНК охарактеризована лише у кількох родів (Ishchenko et al., 2018; Peng et al., 2008; Roser et al., 2001). Тому ми поставили перед собою завдання охарактеризувати молекулярну організацію 5S рДНК у такого широкого розповсюдженого та економічно важливого виду, як пажитниця багаторічна (*Lolium perenne* L.) та порівняти її з іншими представниками триби Poae.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження був зразок *Lolium perenne*, зібраний на території заказнику Цецино (Чернівецька обл.). Загальну ДНК екстрагували зі свіжого листа згідно стандартного протоколу з використанням цетавлону в якості детергента (Rogers, Bendich, 1985).

Ампліфікацію повторюваної ділянки 5S рДНК проводили методом ПЛР з використанням універсальної пари праймерів Pr5S-L-Not (5'-CAATGCGGCCGCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3') + Pr5S-R-Not (5'-CATTGCGGCCGCTTAACTTCGGAGTTCTGATGGGA-3'), які комплементарні до консервативної ділянки, що кодує 5S рРНК у покритонасінних рослин (Тинкевич та ін., 2015; Тункевич, Volkov, 2014; Volkov et al., 2001) і забезпечують ампліфікацію повного МГС та фланкуючих ділянок кодувальної послідовності. Ці праймери містять додатковий сайт впізнавання рестриктази *NotI* (GCGGCCGC — підкреслено вище), який було використано при клонуванні.

Реакційна суміш для ПЛР загальним об'ємом 25 мкл містила такі компоненти: 10–30 нг ДНК, 1,0 од. акт. ДНК-полімерази (Phusion DNA polymerase, Thermoscientific), 0,1 мМ суміші дезоксирибонуклеотидфосфатів, 1^x буфер для ПЛР та 0,5 мкМ кожного з праймерів. ПЛР проводили з використанням ампліфікатора Mini-Cycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази — 95 °С, 2 хв; (2) денатурація ДНК — 95 °С, 40 с; (3) гібридизація праймерів — 60 °С, 30 с; (4) синтез ДНК — 72 °С, 40 с; (5) закінчення ампліфікації — 72 °С, 10 хв; припинення реакції — 4 °С; загальна кількість циклів ампліфікації —

35. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофоретичного аналізу у 1,5 % агарозному гелі та використовували для клонування.

Отримані фрагменти ДНК обробляли рестриктазою *NotI* та лігували у плазмідний вектор рBluescript-KS. В подальшому методом електропорації з використанням приладу *E. coli* Pulsher (BioRad, США) проводили трансформацію компетентних клітин *Escherichia coli* штаму XL-blue продуктами лігування. Колонії, які містили рекомбінантні плазмідні, виявляли методом синьо-білого скринінгу. Плазмідні виділяли методом лужного лізису (Sambrook et al., 1989).

Наявність вставки у плазмідах перевіряли за допомогою ПЛР із стандартними праймерами M13/pUC forward (For) та reverse (Rev), сайти гібридизації яких знаходяться в плазмідній ДНК з двох боків від полілінкеру. Рекомбінантні плазмідні, які містили вставки 5S рДНК, секвенували на фірмі GATC (Німеччина). Первинну обробку нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою комп'ютерних програм Chromas та DNASTAR. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Clustal W (Higgins et al., 1992), а пошук гомологічних послідовностей у Genbank — з використанням програми BLAST (Altschul et al., 1997).

Результати та обговорення

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації 5S рДНК *L. perenne* показав, що для даного зразка утворюється лише один ПЛР-продукт довжиною приблизно 290 нуклеотидних пар (нп). Це свідчить про наявність у геномі лише одного за довжиною класу 5S рДНК. Раніше у видів родини Poaceae було описано випадки, коли в індивідуальному геномі присутні або один, або декілька варіантів МГС 5S рДНК, які відрізняються між собою за довжиною чи за нуклеотидною послідовністю (Ishchenko et al., 2018; Volkov, Panchuk, 2014). На загал традиційно вважається, що повтори рибосомальних генів високоподібні між собою в межах одного виду внаслідок концертної еволюції (Coen et al., 1997; Volkov et al., 2001; Volkov et al., 2003).

В ході подальших експериментів по клонуванню було відібрано 10 колоній трансформантів. Після перевірки наявності у рекомбінантних плазмідах вставки 5S рДНК два клони було секвеновано.

Комп'ютерний аналіз нуклеотидних послідовностей виявив, що отримані клони містять ділянку МГС 5S рДНК, яка з обох боків фланкова-

на фрагментами кодувальної послідовності та використаними для ПЛР праймерами. Було встановлено, що довжина МГС у *L. perenne* становить 188–189 нп, а вміст GC-пар — 46–47 % (табл. 1). Раніше було показано, що у представників родів *Avena*, *Dactylis*, *Deschampsia*, *Helictotrichon*, *Lagurus*, *Pseudarrhenatherum* та *Trisetum* (які, як і *Lolium*, належать до триби Pоeae (Soreng et al., 2015) розмір МГС знаходиться у межах від 88 до 329 нп (Ishchenko et al., 2018; Peng et al., 2008; Roser et al., 2001; Volkov, Panchuk, 2014). Отже, розмір МГС у *L. perenne* є типовим для представників триби Pоeae.

Таблиця 1. Характеристика клонованих послідовностей МГС 5S рДНК *L. perenne*

Клон	Довжина МГС, нп	Вміст GC-пар, %
Lore4	189	47,62
Lore7	188	46,81

Вирівнювання послідовностей показало, що для розшифрованих нами клонів Lore4 та Lore7 рівень подібності МГС становить 95 %, тобто є високим. Раніше було виявлено, що у представників спорідненої триби Triticeae (родина Pоeae) у геномі присутні як мінімум два класи повторів 5S рДНК (Baum et al., 2004). Проте, у представників триби Pоeae картина видається більш складною. Так, для кількох

видів родів *Avena* та *Dactylis* було знайдено лише по одному класу повторів (Peng et al., 2008; Volkov, Panchuk, 2014). Водночас, геноми *H. bromoides* та *Deschampsia antarctica* містять по декілька варіантів повторів, які, імовірно, належать до різних кластерів 5S рДНК і відповідають різним хромосомним локусам (Amosova et al., 2017; Ishchenko et al., 2018; Navrotska et al., 2018; Roser et al., 2001; Volkov, Panchuk, 2014). У *Dactylis glomerata* рівень подібності МГС становить 97–99 % в межах одного класу повторів, а у *Deschampsia antarctica* — 91–99 % в межах одного структурного класу та 81–84 % при порівнянні різних структурних класів (Ishchenko et al., 2018; Volkov, Panchuk, 2014). Відповідно, можна вважати, що у *L. perenne* наявний лише один варіант МГС 5S рДНК.

Отримані нами послідовності *L. perenne* було порівняно з МГС 5S рДНК інших представників родини Pоeae. За результатами пошуку у Genbank було встановлено, що найбільшу подібність з МГС 5S рДНК *L. perenne* мають інші представники триби Pоeae. При цьому рівень подібності знаходиться в межах від 46 % (*Dactylis glomerata*) до 62–63 % (*H. convolutum* та *T. spicatum*) (табл. 2). Отже, МГС 5S рДНК *L. perenne* суттєво відрізняється від інших досліджених на сьогодні представників триби Pоeae.

Таблиця 2. Рівень подібності (%) МГС 5S рДНК представників триби Pоeae

Назва клону	Lore4	Lore7	Heco	Trsp	Phco	Dean A1.1	Dean A8.10	Dean A10.11	Heae	Avma1	Avma2	Laov	Trja	Dagl1	Dagl2
Lore4	--	95,4	62,2	61,3	61,3	55,8	58,1	59,9	58,1	57,1	57,1	54,4	55,3	47,0	45,6
Lore7		--	62,7	61,8	60,8	57,6	59,4	60,8	58,1	59,0	57,1	55,8	55,3	47,5	47,0
Heco			--	85,3	61,3	63,1	63,1	64,1	73,3	71,4	71,9	77,9	67,7	60,4	59,0
Trsp				--	64,5	61,3	65,0	65,4	74,7	72,4	72,8	83,9	66,4	61,8	60,4
Phco					--	48,8	51,2	51,2	56,2	59,0	56,7	59,9	57,6	49,8	49,3
DeanA1.1						--	81,1	78,3	55,3	61,3	52,1	55,8	54,8	51,6	51,2
DeanA8.10							--	92,2	61,3	62,7	55,3	56,7	55,3	50,2	49,3
DeanA10.11								--	62,7	62,2	55,3	58,1	56,7	51,6	50,2
Heae									--	65,0	68,7	66,4	62,7	58,1	57,6
Avma1										--	66,4	64,5	69,1	60,4	59,9
Avma2											--	67,7	63,1	59,9	58,5
Laov												--	62,7	57,1	56,7
Trja													--	62,7	62,2
Dagl1														--	98,6
Dagl2															--

Примітка. Скорочення назв та реєстраційні номери клонів: Heco — *Helictotrichon convolutum*, AJ390078; Trsp — *Trisetum spicatum*, AJ390233; Phco — *Phalaris coerulescens*, Y09573; Dean A1.1 — *Deschampsia antarctica*, MH071970; Dean A8.10 — *Deschampsia antarctica*, MH071973; Dean A10.11 — *Deschampsia antarctica*, MH071974; Heae — *Helictochloa aetolica*, AJ390137; Avma1 — *Avena macrostachya*, EF064638; Avma2 — *A. macrostachya*, AJ390215; Laov — *Lagurus ovatus*, AJ390222; Trja — *Tricholemma jahandiezii*, AJ390218; Dagl1 — *Dactylis glomerata*, KF743553; Dagl2 — *Dactylis glomerata*, KF743554.

Детальне порівняння МГС 5S рДНК *L. perenne*, *H. convolutum* та *T. spicatum* показало (рис. 1), що з моменту дивергенції цих трьох видів еволюційні зміни МГС полягали у замінах нуклеотидів та у невеличких інсерціях та делеціях. Зокрема, при порівнянні окремих клонів *L. perenne* із консенсусною послідовністю вияв-

лено 11 транзицій та 13 трансверсій для клону Lope4, і 11 транзицій та 11 трансверсій для клону Lope7 (рис. 1). Крім того, знайдено вставку одного (Lope7) або двох (Lope4) нуклеотидів на початку МГС та двонуклеотидну делецію у обох клонів в позиції 45–46 від кінця кодувальної ділянки.

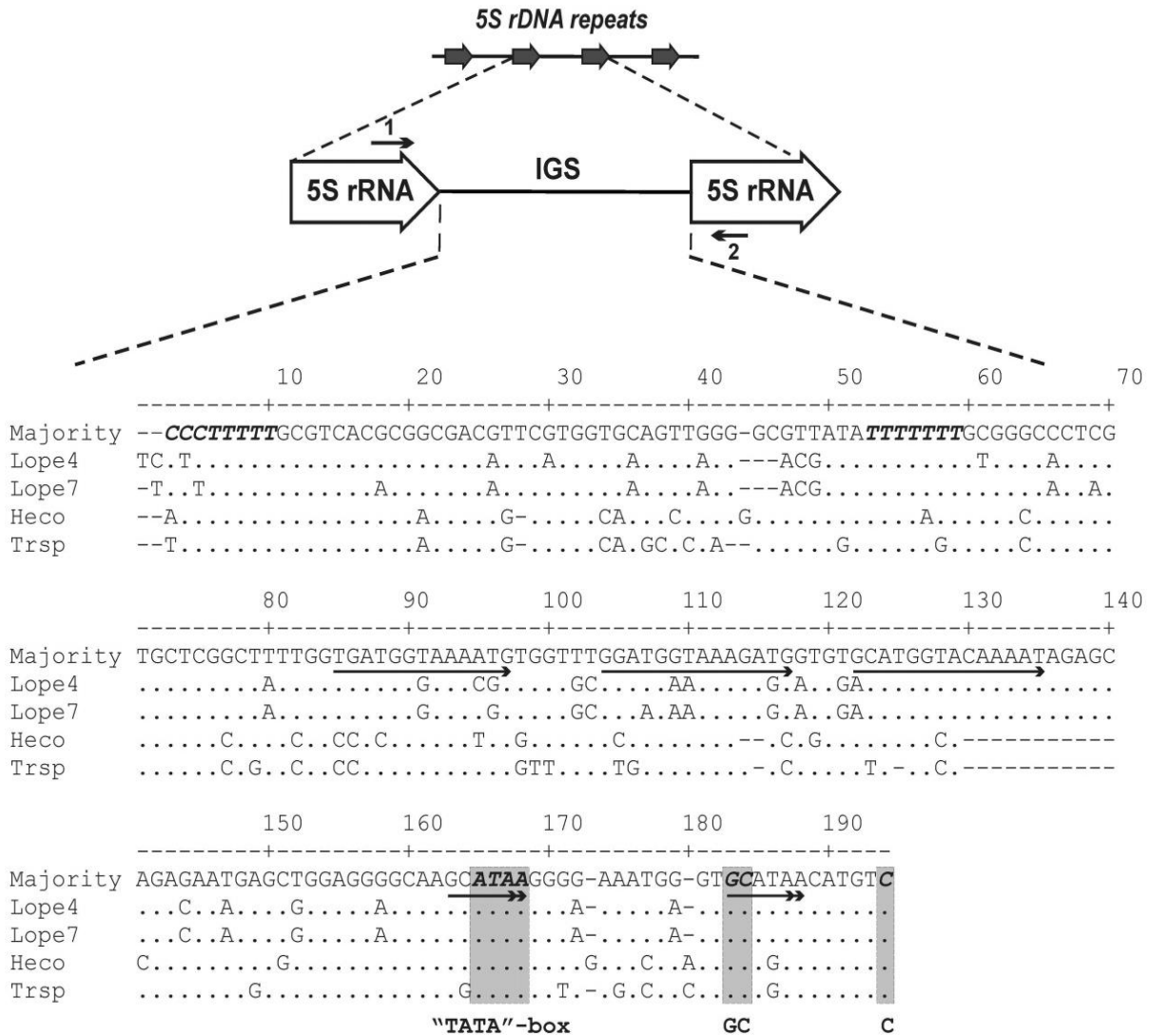


Рис. 1. Структурна організація МГС 5S рДНК. Жирним курсивом виділено оліго-Т послідовність потенційного термінатора та передбачувані зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III. Стрілками відмічено розташування повторюваних елементів. Скорочення назв клонів наведено у табл. 2.

У центральній частині МГС *L. perenne* присутні три субповтори довжиною 14 нп (рис. 1, 2). Ці субповтори, імовірно, виникли внаслідок тандемної дуплікації ще до дивергенції *L. perenne*, *H. convolutum* та *T. spicatum*. Протягом подальшої еволюції у кожній копії субповторів накопи-

чувались індивідуальні заміни нуклеотидів, а у *H. convolutum* та *T. spicatum* фрагмент третього субповтору було взагалі втрачено внаслідок делеції.

Consensus	GGATGGTAAAAATG
85	T.....-... 97
104G... 117
122	.C.....C...AT 135

Рис. 2. Порівняння субповторів у МГС 5S рДНК *L. perenne*.

Порівняння МГС 5S рДНК *L. perenne* та представників дев'яти родів триби *Roeae* дозволило ідентифікувати в межах МГС декілька мотивів, які є відносно консервативними в еволюції, що може свідчити про їх функціональне

значення (рис. 1, 3). Зокрема, консервативні мотиви у МГС можуть бути задіяні у ініціації та термінації транскрипції 5S рДНК. Проведений нами порівняльний аналіз послідовностей МГС видів триби *Roeae* показав, що на початку МГС у *L. perenne* знаходиться консервативний десятинуклеотидний Т-багатий мотив, який, імовірно, залучений до термінації транскрипції 5S рДНК. Крім того, у МГС *L. perenne* у позиції +53 нп наявний ще один Т-багатий мотив, який складається з семи залишків тимідину (рис. 1, 3). Можливо, цей мотив слугує додатковим (запасним) сайтом термінації транскрипції.

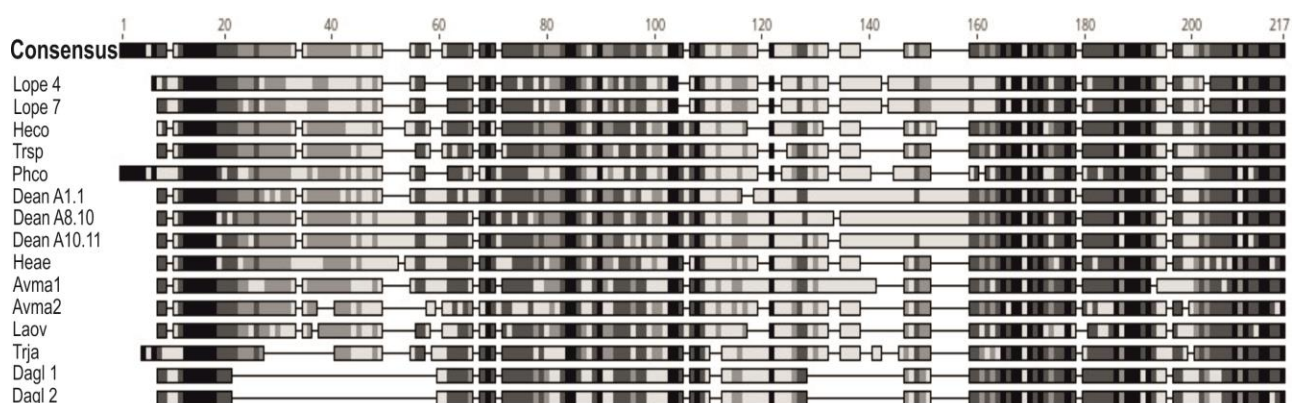


Рис. 3. Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей МГС 5S рДНК представників триби *Roeae*. Скорочення назв клонів наведено у табл. 2. Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: — менше 60 %, — 60–80 %, — 80–100 %, — 100 %.

У *Arabidopsis thaliana* до елементів зовнішнього промотора РНК-полімерази III належать ТАТАТА-подібний мотив, динуклеотид GC та нуклеотид С, розташовані, відповідно, на відстані -28 нп, -13 нп та -1 нп перед початком кодувальної ділянки (Douet, Tourmente, 2007; Layat et al., 2012). Схожі мотиви були знайдені і у інших покритонасінних рослин (Русак та ін., 2016; Тинкевич, Волков, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Шелифіст та ін., 2018; Тункевич, Volkov, 2014; Volkov et al., 2017). У *L. perenne* та у інших представників триби *Roeae* консервативний мотив GC та нуклеотид С було виявлено в позиціях -12 та -1 нп, відповідно (рис. 1). Крім того, у позиції -28 від початку кодувальної ділянки у *L. perenne* та інших видів злаків знаходиться консервативна послідовність АТАА, яка нагадує ТАТА-бокс. Зазначимо, що на відміну від злаків у всіх досліджених на сьогодні видів дводольних АТ-багаті мотиви у цій позиції мають розмір 6 нп, або більше (Русак та ін., 2016; Тинкевич, Волков, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Шелифіст

та ін., 2018; Douet, Tourmente, 2007; Тункевич, Volkov, 2014; Volkov et al., 2017).

Цікаво, що у МГС *L. perenne* консервативні мотиви АТАА та GC, які є потенційними елементами зовнішнього промотора РНК-полімерази III, представлені двома копіями у складі короткого субповтору GCАТАА (рис. 1). Чи ця структурна особливість впливає на ініціацію транскрипції, залишається незрозумілим та потребує додаткового прояснення.

Висновки

У геномі *L. perenne* присутній тільки один варіант повтору 5S рДНК з МГС довжиною 188–189 нп, до складу якого входять консервативні мотиви, що відповідають потенційним елементам промотора та термінатора РНК-полімерази III. Рівень подібності МГС *L. perenne* та інших представників триби *Roeae* лежить в межах від 46 до 62–63 %, що дозволяє використовувати цю ділянку для уточнення філогенетичних відносин між видами та родами триби *Roeae*.

Подяки. Автори висловлюють подяку доц. В. В. Буджаку (кафедра ботаніки, лісового і садово-паркового господарства Чернівецького національного університету) за допомогу у визначенні дослідженого зразка *L. perenne* та проф. Р. А. Волкову (Кафедра молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету) за участь у обговоренні отриманих результатів.

Перелік літератури

1. Русак О. О., Петрачук В. І., Панчук І. І., Волков Р. А. Молекулярна організація 5S рДНК двох українських популяцій явора (*Acer pseudo-platanus*). *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2016. Том 14, № 2. С. 216–220.
2. Тинкевич Ю. О., Волков Р. А. Новий структурний клас 5S рДНК *Rosa wichurana* Среп. *Доповіді Національної академії наук України*. 2014. № 5. С. 143–148.
3. Тинкевич Ю. О., Невельська А. О., Чорней І. І., Волков Р. А. Організація та мінливість міжгенного спейсера 5S рДНК *Lathyrus*. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2015. Том 13, № 1. С. 81–87.
4. Шелифіст А. Є., Тинкевич Ю. О., Волков Р. А. Молекулярна організація 5S рДНК *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2018. Том 16, № 1. С. 61–68.
5. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 1997. Vol. 25, No. 17. P. 3389–3402.
6. Amosova A. V., Bolsheva N. L., Zoshchuk S. A. et al. Comparative molecular cytogenetic characterization of seven *Deschampsia* (Poaceae) species. *PLOS One*. 2017. Vol. 12, No. 4. P. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0175760.
7. Baum B. R., Bailey, L. G., Belyayev A. et al. 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*. 2004. Vol. 47, No. 3. P. 590–599. doi: 10.1139/g03-146.
8. Baum B. R., Edwards T., Mamuti M., Johnson D. A. Phylogenetic relationships among the polyploid and diploid *Aegilops* species inferred from the nuclear 5S rDNA sequences (Poaceae: Triticeae). *Genome*. 2012. Vol. 55, No. 3. P. 177–193. doi: 10.1139/g2012-006.
9. Bolsheva N. L., Melnikova N. V., Kirov I. V. et al. Evolution of blue-flowered species of genus *Linum* based on high-throughput sequencing of ribosomal RNA genes. *BMC Evol. Biol.* 2017. Vol. 17, No. 2. P. 23–36. doi: 10.1186/s12862-017-1105-x.
10. Clayton W. D., Govaerts R., Harman K. T. et al. World checklist of Poaceae. *Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew*: 2014. URL: <http://apps.kew.org/wcsp/> — 2014.
11. 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.
12. Denk T., Grimm G. The oaks of western Eurasia: Traditional classifications and evidence from two nuclear markers. *Taxon*. 2010. Vol. 59, No. 2. P. 351–366.
13. Douet J., Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*. 2007. Vol. 99, No. 1. P. 5–13. doi: 10.1038/sj.hdy.6800964.
14. Duvall M. R., Davis. J. I., Clark L. G. et al. Phylogeny of the Grasses (Poaceae) revisited. *J. Syst. Evol. Bot.* 2007. Vol. 23, No. 1. P. 237–247. doi: 10.5642/aliso.20072301.18.
15. Givnish T. J., Ames M., Mcneal J. R. et al. Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 2010. Vol. 97, No. 4. P. 584–616. doi: 10.3417/2010023.
16. Grimm G. W., Schlee M., Komarova N. Y. et al. Low-level taxonomy and intrageneric evolutionary trends in higher plants. *Nova Acta Leopoldina NF.* 2005. Vol. 92, No. 342. P. 129–145.
17. Higgins D. G., Bleasby A. J., Fuchs R. CLUSTAL V: Improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 1992. Vol. 8. P. 189–191. doi: 10.1093/bioinformatics/8.2.189.
18. Ishchenko O. O., Panchuk I. I., Andreev I. O. et al. Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol. Genet.* 2018. Vol. 52, No. 6. P. 416–421. doi: 10.3103/S0095452718060105.
19. Layat E., Saez-Vasquez J., Tourmente S. Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2012. Vol. 53, No. 2. P. 267–276. doi: 10.1093/pcp/pcr177.
20. Mlinarec J., Franjevic D., Bockor L., Besendorfer V. Diverse evolutionary pathways shaped 5S rDNA of species of tribe Anemoneae (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Bot. J. Linn. Soc.* 2016. Vol. 182, No. 1. P. 80–99. doi:10.1111/boj.12452.
21. Navrotska D., Andreev A., Betekhtin A. et al. Assessment of the molecular cytogenetic, morphometric and biochemical parameters of *Deschampsia antarctica* from its southern range limit in maritime Antarctic. *Pol. Polar Res.* 2018. Vol. 39, No. 4. P. 525–248. doi: 10.24425/118759.
22. Peng Y. Y., Wei Y. M., Baum B. R., Zheng Y. L. Molecular diversity of the 5S rRNA gene and genomic relationships in the genus *Avena* (Poaceae: Aveneae). *Genome*. 2008. Vol. 51, No. 2. P. 137–154. doi.org/10.1139/G07-111.
23. Quintanar A., Castroviejo S., Catalan P. Phylogeny of the tribe Aveneae (Pooideae, Poaceae) inferred from plastid trnT-F and nuclear ITS sequences. *Am. J. Bot.* 2007. Vol. 94, No. 9. P. 1554–1569. doi: 10.3732/ajb.94.9.1554.
24. 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. doi: 10.1007/BF00020088.

25. Roser M., Winterfeld G., Grebenstein B., Hemleben V. Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae). *Mol. Phylogen. Evol.* 2001. Vol. 21, No. 2. P. 198–217. doi: 10.1006/mpev.2001.1003.
 26. Saini A., Jawali N. Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* 2009. Vol. 280. P. 187–206. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4.
 27. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1626 p.
 28. Soreng R. J., Peterson P. M., Romschenko K. et al. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *J. Syst. Evol.* 2015. Vol. 53, No. 2. P. 117–137. doi: 10.1111/jse.12150/epdf.
 29. Tynkevich Y. O., Volkov R. A. Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* 2014. Vol. 48, No. 1. P. 1–6. doi: 10.3103/S0095452714010095.
 30. Volkov A. R., Panchuk I. I. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2014. Т. 12, № 1. С. 3–11.
 31. 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, No. 8. P. 1273–1282. doi: 10.1007/s001220100670.
 32. Volkov R. A., Panchuk I. I., Borisjuk L. G., Borisjuk M. V. Plant rDNA: Organization, evolution, and using. *Cytol. Genet.* 2003. Vol. 37, No. 1. P. 68–72.
 33. Volkov R. A., Kozeretka I. A., Kyryachenko S. S. et al. Molecular evolution and variability of ITS1 and ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the Maritime Antarctic. *Polar Sci.* 2010. Vol. 4, No. 3. P. 469–478. doi: 10.1016/j.polar.2010.04.011.
 34. Volkov R. A., Panchuk I. I., Borisjuk N. V. et al. Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* 2017. Vol. 17, No. 1. P. 1–15. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6.
 35. Zeng Q., Chen H., Zhang C. et al. Definition of eight mulberry species in the genus *Morus* by internal transcribed spacer-based phylogeny. *PLOS One*. 2015. Vol. 10, No. 8. P. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0135411.
- References**
1. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 1997. Vol. 25, No. 17. P. 3389–3402.
 2. Amosova A. V., Bolsheva N. L., Zoshchuk S. A. et al. Comparative molecular cytogenetic characterization of seven *Deschampsia* (Poaceae) species. *PLOS One*. 2017. Vol. 12, No. 4. P. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0175760.
 3. Baum B. R., Bailey L. G., Belyayev A. et al. 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*. 2004. Vol. 47, No. 3. P. 590–599. doi: 10.1139/g03-146.
 4. Baum B. R., Edwards T., Mamuti M., Johnson D. A. Phylogenetic relationships among the polyploid and diploid *Aegilops* species inferred from the nuclear 5S rDNA sequences (Poaceae: Triticeae). *Genome*. 2012. Vol. 55, No. 3. P. 177–193. doi: 10.1139/g2012-006.
 5. Bolsheva N. L., Melnikova N. V., Kirov I. V. et al. Evolution of blue-flowered species of genus *Linum* based on high-throughput sequencing of ribosomal RNA genes. *BMC Evol. Biol.* 2017. Vol. 17, No. 2. P. 23–36. doi: 10.1186/s12862-017-1105-x.
 6. Clayton W. D., Govaerts R., Harman K. T. et al. World checklist of Poaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew: 2014. URL: <http://apps.kew.org/wcsp/> — 2014.
 7. 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.
 8. Denk T., Grimm G. The oaks of western Eurasia: Traditional classifications and evidence from two nuclear markers. *Taxon*. 2010. Vol. 59, No. 2. P. 351–366.
 9. Douet J., Tourmente S. Transcription of the 5S rDNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*. 2007. Vol. 99, No. 1. P. 5–13. doi: 10.1038/sj.hdy.6800964.
 10. Duvall M. R., Davis J. I., Clark L. G. et al. Phylogeny of the Grasses (Poaceae) revisited. *J. Syst. Evol. Bot.* 2007. Vol. 23, No. 1. P. 237–247. doi: 10.5642/aliso.20072301.18.
 11. Givnish T. J., Ames M., Mcneal J. R. et al. Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 2010. Vol. 97, No. 4. P. 584–616. doi: 10.3417/2010023.
 12. Grimm G. W., Schlee M., Komarova N. Y. et al. Low-level taxonomy and intrageneric evolutionary trends in higher plants. *Nova Acta Leopoldina NF.* 2005. Vol. 92, No. 342. P. 129–145.
 13. Higgins D. G., Bleasby A. J., Fuchs R. CLUSTAL V: Improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 1992. Vol. 8. P. 189–191. doi: 10.1093/bioinformatics/8.2.189
 14. Ishchenko O. O., Panchuk I. I., Andreev I. O. et al. Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol. Genet.* 2018. Vol. 52, No. 6. P. 416–421. doi: 10.3103/S0095452718060105
 15. Layat E., Saez-Vasquez J., Tourmente S. Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2012. Vol. 53, No. 2. P. 267–276. doi: 10.1093/pcp/pcr177.
 16. Mlinarec J., Franjevic D., Bockor L., Besendorfer V. Diverse evolutionary pathways shaped 5S rDNA of species of tribe Anemoneae (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Bot. J. Linn. Soc.* 2016. Vol. 182, No. 1. P. 80–99. doi: 10.1111/boj.12452.
 17. Navrotska D., Andreev I. O., Betekhtin A. et al. Assessment of the molecular cytogenetic, morphometric and biochemical parameters of *Deschampsia antarctica* from its southern range limit in maritime

- Antarctic. *Pol. Polar Res.* 2018. Vol. 39, No. 4. P. 525–248. doi: 10.24425/118759.
18. Peng Y. Y., Wei Y. M., Baum B. R., Zheng Y. L. Molecular diversity of the 5S rRNA gene and genomic relationships in the genus *Avena* (Poaceae: Aveneae). *Genome*. 2008. Vol. 51, No. 2. P. 137–54. doi.org/10.1139/G07-111.
 19. Quintanar A., Castroviejo S., Catalan P. Phylogeny of the tribe Aveneae (Pooideae, Poaceae) inferred from plastid trnT-F and nuclear ITS sequences. *Am. J. Bot.* 2007. Vol. 94, No. 9. P. 1554–1569. doi: 10.3732/ajb.94.9.1554.
 20. 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. doi: 10.1007/BF00020088.
 21. Roser M., Winterfeld G., Grebenstein B., Hemleben V. Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae). *Mol. Phylog. Evol.* 2001. Vol. 21, No. 2. P. 198–217. doi: 10.1006/mpev.2001.1003.
 22. Rusak O. O., Petrashchuk V. I., Panchuk I. I., Volkov R. A. Molecular organization of 5S rDNA in two Ukrainian populations of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2016. Vol. 14, No. 2. P. 216–20.
 23. Saini A., Jawali N. Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* 2009. Vol. 280. P. 187–206. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4.
 24. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1626 p.
 25. Shelyfist A. Ie., Tynkevich Yu. O., Volkov R. A. Molecular organization of 5S rDNA *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2018. Vol. 16, No. 1. P. 61–68.
 26. Soreng R. J., Peterson P. M., Romschenko K. et al. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *J. Syst. Evol.* 2015. Vol. 53, No. 2. P. 117–137. doi: 10.1111/jse.12150/epdf.
 27. Tynkevich Y. O., Nevelska A. O., Chorney I. I., Volkov R. A. Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2015. Vol. 13, No. 1. P. 81–87.
 28. Tynkevich Y. O., Volkov, R. A. Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* 2014. Vol. 48, No. 1. P. 1–6. doi: 10.3103/S0095452714010095.
 29. Tynkevich Yu. O., Volkov R. A. Novel structural class of 5S rDNA of *Rosa wichurana* Crep. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. 2014. No. 5. P. 143–148.
 30. Volkov A. R., Panchuk I. I. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2014. Vol. 12, No 1. P. 3–11.
 31. 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, No. 8. P. 1273–1282. doi: 10.1007/s001220100670.
 32. Volkov R. A., Panchuk I. I., Borisjuk L. G., Borisjuk M. V. Plant rDNA: Organization, evolution, and using. *Cytol. Genet.* 2003. Vol. 37, No. 1. P. 68–72.
 33. Volkov R. A., Kozeretka I. A., Kyryachenko S. S. et al. Molecular evolution and variability of ITS1 and ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the Maritime Antarctic. *Polar Sci.* 2010. Vol. 4, No. 3. P. 469–478. doi: 10.1016/j.polar.2010.04.011
 34. Volkov R. A., Panchuk I. I., Borisjuk N. V. et al. Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* 2017. Vol. 17, No. 1. P. 1–15. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6.
 35. Zeng Q., Chen H., Zhang C. et al. Definition of eight mulberry species in the genus *Morus* by internal transcribed spacer-based phylogeny. *PLOS One*. 2015. Vol. 10, No. 8. P. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0135411.

Представлено І. О. Андрєєвим
Надійшла 20.11.2018

MOLECULAR ORGANIZATION OF 5S rDNA OF PERENNIAL RYEGRASS *LOLIUM PERENNE* L.

O. O. Ishchenko, I. I. Panchuk

Dept. of Molecular Genetics and Biotechnology
Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynski str., 2
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

Aim. Ribosomal DNA (rDNA) is an important tool for molecular taxonomy and represents a convenient model for studying the evolution of repeated sequences. However, for many groups of angiosperms, 5S rDNA remains poorly studied, in particular for such a large group as the Poaceae (Gramineae) family. Accordingly, it was decided to analyze the molecular organization of 5S rDNA in the widespread and economically important species *Lolium perenne*. **Methods.** DNA extraction, PCR amplification, cloning and sequencing. **Results.** Two clones of *L. perenne* 5S rDNA were sequenced. It was shown that only one variant of 5S rDNA repeats with a 188–189 bp-long intergenic spacer (IGS) is present in the genome of *L. perenne*. Putative RNA polymerase III promoter elements were detected in the IGS. The level of IGS sequence similarity between representatives of different genera of the tribe Poeae ranges from 46 to 63%. **Conclusions.** Comparison of IGS can be used to clarify the phylogenetic relationship between taxa of low ranks, in particular, between species and genera of the tribe Poeae.

Keywords: 5S rDNA, intergenic spacer, molecular evolution, *Lolium*, Poaceae.