

5S рДНК ТИМОФІЇВКИ ЛУЧНОЇ *PHLEUM PRATENSE* L.

О.О. ПЩЕНКО¹, Т.О. ДЕРЕВЕНКО², І.І. ПАНЧУК^{1*}

¹Кафедра молекулярної генетики та біотехнології,

²Ботанічний сад

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,

вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012

*e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

Ділянки, які кодують 5S рибосомну РНК (5S рДНК), необхідні для забезпечення біогенезу рибосом. Ці ділянки присутні у геномі всіх еукаріот у вигляді численних тандемно організованих одиниць і являють собою універсальну модель для вивчення еволюції повторюваних послідовностей. Кожна повторювана одиниця 5S рДНК складається з еволюційно консервативної кодувальної ділянки та міжгенного спейсера (МГС), який еволюціонує відносно швидко. В МГС присутні елементи зовнішнього промотора та термінатора РНК-полімерази III, які необхідні для транскрипції 5S рДНК. Проте, у різних родинах покритонасінних рослин ці мотиви можуть відрізнятися.

Привабливою групою рослин для проведення порівняльних досліджень 5S рДНК є родина Злакові (*Poaceae*). Проте, для цієї родини організація 5S рДНК залишається все ще вивченою недостатньо. Зокрема, досі нічого невідомо про молекулярну організацію 5S рДНК у такого широко поширеного та економічно важливого роду, як *Phleum*. Отже, ми поставили перед собою завдання клонувати, секвенувати та проаналізувати будову повторюваної ділянки 5S рДНК тимофіївки лучної *Ph. pratense* L. Встановлено, що в геномі цього виду присутній тільки один варіант повторюваної одиниці 5S рДНК із довжинами кодувальної ділянки та МГС 120 та 209 нп, відповідно. Центральна частина МГС складається з п'яти тандемно організованих дивергованих субповторів, які відрізняються між собою замінами нуклеотидів та невеличкими делеціями/інсерціями. На початку МГС присутня оліго-Т послідовність термінатора транскрипції РНК-полімерази III. У позиціях – 28, – 15 та – 1 нп перед кодувальною ділянкою виявлено консервативні мотиви АТАА, GC та С, які відповідають потенційним елементам зовнішнього промотора 5S рДНК. Порівняльний аналіз отриманих послідовностей свідчить, що розташування мотиву GC у позиції – 15 нп перед кодувальною ділянкою не зустрічається у жодного з досліджених раніше видів покритонасінних рослин, тобто є унікальним. Отримані результати вказують на різницю у ініціації транскрипції РНК-полімерази III у дво- та однодольних рослин.

Ключові слова: 5S рДНК, міжгенний спейсер, молекулярна еволюція, повторювані послідовності, *Phleum pratense*, *Poaceae*.

Вступ. Переважаючим компонентом в геномі вищих рослин є повторювальні послідовності, значна частина яких є специфічними для споріднених видів. Виключення становлять ділянки, які кодують рРНК (рДНК), і які наявні у всіх організмів. Відповідно, рДНК являє універсальну модель для вивчення еволюції повторюваних послідовностей (Cloix et al., 2000; Denk and Grimm, 2010; Poczai and Huvonen, 2010; Volkov et al., 2003; Volkov et al., 2017).

5S рДНК належить до класу тандемно організованих середньо повторюваних послідовностей. Кожна повторювана одиниця 5S рДНК складається з кодувальної ділянки та міжгенного спейсера (МГС). Кодувальна ділянка є еволюційно консервативною, і помітна різниця в її послідовності спостерігається лише при порівнянні віддалених таксонів. Натомість, послідовність МГС швидко накопичує мутації і Біологічні системи. Т. 10. Вип. 2. 2018

нерідко значно відрізняється вже на міжвидовому або міжпопуляційному рівні (Fulneczek et al., 2002; Ishchenko et al., 2018; Volkov et al., 2001; Volkov et al., 2003).

В МГС 5S рДНК присутні елементи зовнішнього промотора та термінатора РНК-полімерази III, яка забезпечує транскрипцію цих генів. Зокрема, це такі мотиви як ТАТА-бокс та оліго-Т послідовність (Layat et al., 2012). Проте, виявлено, що у різних родинах покритонасінних рослин ці мотиви можуть відрізнятися (Русак та ін., 2016; Тинкевич та Волков, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Шелифіст та ін., 2018; Baum et al., 2003; Ishchenko et al., 2018; Roser et al., 2001; Volkov and Panchuk, 2014). Тому для розуміння закономірностей еволюції транскрипційного апарату видається важливим порівняти молекулярну організацію МГС 5S рДНК у широкого кола видів.

Привабливою групою рослин для проведення порівняльних досліджень 5S рДНК є така велика родини, як Poaceae. На загал для цієї групи 5S рДНК все ще залишається недостатньо вивченою, незважаючи на попередні дослідження, проведені для представників кількох родів (Ishchenko et al., 2018; Roser et al., 2001; Peng et al., 2008; Volkov and Panchuk, 2014). Наприклад, нічого невідомо про молекулярну організацію 5S рДНК у такого широко поширеного та економічно важливого роду, як *Phleum*. Отже, ми поставили перед собою завдання клонувати, сиквенувати та проаналізувати будову ділянки 5S рДНК тимофіївки лучної *Phleum pratense* L.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження був зразок *Ph. pratense*, зібраний на території заказнику Цецино (Чернівецька обл.).

Сумарну ДНК екстрагували з свіжих листків (Rogers and Bendich, 1985). Ампліфікацію повторюваної ділянки 5S рДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), клонування ПЛР-продуктів та скринінг рекомбінантних плазмід здійснювали за методикою, яка була описана раніше (Шелифіст та ін., 2018). Для ПЛР було використано пару праймерів 5S-14a-Ph (5'-GCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3') і 5S-15-Ph (5'-GCTTATCGGAGTTCTGATGGGA-3'), які комплементарні до центральної частини кодувальної ділянки 5S рДНК. Застосування цих праймерів забезпечує ампліфікацію повного МГС та фланкувальних ділянок кодувальної послідовності за винятком 6 нп у її центральній частині.

Рекомбінантні плазміди, які містили вставки 5S рДНК, сиквенували 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., 1991).

Результати та обговорення.

Електрофоретичне розділення показало, що отримані ПЛР-продукти мають довжину приблизно 290 нп, що свідчить про наявність в геномі *Ph. pratense* лише одного за довжиною класу повторів 5S рДНК. З літератури відомо, що у Злакових можуть зустрічатись як один, так і декілька класів рДНК, які відрізняються довжиною повтору (Baum et al., 2004; Ishchenko, 2018; Peng et al., 2008).

Отримані ПЛР-продукти клонували у плазмідний вектор. Загалом було ідентифіковано шість плазмід зі вставкою. Два клони - Phpra 1 та Phpra 3 було відібрано для сиквенування.

Комп'ютерний аналіз нуклеотидних послідовностей двох просиквенуваних клонів показав, що вони містять ділянку МГС 5S рДНК, з обох боків фланковану фрагментами кодувальної послідовності та використаними для ПЛР праймерами. Загальна характеристика клонів Phpra 1 та Phpra наведена в табл. 1.

Таблиця 1.

Характеристика 5S рДНК Phleum pratense.

Table 1.

Characterization of 5S rDNA of Phleum pratense.

Назва клону	Довжина МГС, нп	Вміст GC пар, %	
		Кодувальна ділянка	МГС
Phpra 1	208	56,67	52,88
Phpra 3	209	56,67	53,11

Було встановлено, що сумарна довжина фланкуючих МГС фрагментів кодувальної ділянки (включаючи послідовність ПЛР-праймерів) в обох клонах складає 114 нп. Беручи до уваги, що при застосуванні використаних праймерів 6 нп центральної частини кодувальної ділянки залишаються неампліфікованими, можна стверджувати, що загальний розмір ділянки, яка кодує 5S рДНК у *Ph. pratense* складає 120 нп. Такий розмір кодувальної ділянки характерний для переважної більшості вищих рослин (Pozzai and Hyvonen, 2010; Singh and Ahuja, 2006; Tynkevich and Volkov, 2014; Volkov et al., 2017). Також варто зазначити, що послідовності кодувального фрагменту в обох клонів є ідентичними.

Визначення границь кодувальної ділянки дозволило встановити, що розміри МГС становлять 208 та 209 нп для клонів Phpra 1 та Phpra 3, відповідно (табл. 1). Порівняння із даними попередніх досліджень показує, що така довжина МГС є типовою для представників родини Poaceae, у яких вона знаходиться в межах від 88 до 329 нп (Peng et al., 2008; Röser et al., 2001; Volkov et al., 2014).

Вирівнювання послідовностей клонів показало високу подібність між ними - 97,4%. Різниця в нуклеотидній послідовності між Phpra 1 та Phpra 3 виражається чотирма однонуклеотидними транзиціями та трьома трансверсіями, рівномірно розподіленими по всій довжині МГС. Також у клоні Phpra 3 наявний додатковий нуклеотид Т в 7 позиції від кінця кодувальної ділянки, що і пояснює різницю в довжині МГС двох клонів (табл. 1, рис. 1).

Детальний аналіз отриманих сиквенсів показав, що в центральній частині МГС *Ph. pratense* присутні п'ять дивергованих субповторів (рис. 1, 2). Перший, другий і третій субповтори мають довжину 26, 22 та 25 нп, тоді як четвертий і п'ятий - лише 15 та 17 нп. Ці субповтори, імовірно, виникли внаслідок тандемної дуплікації батьківської послідовності довжиною 24 нп. Протягом подальшої еволюції у кожній копії субповторів мали місце заміни окремих нуклеотидів, а також - невеличкі делеції та інсерції. Саме за рахунок делецій і відбулося вкорочення четвертого і п'ятого субповторів.

В МГС *Ph. pratense* виявлено потенційні елементи зовнішнього промотора 5S рДНК. У арабідопсису до таких елементів належить мотив ТАТАТА, розташований на 3'-кінці МГС в позиції – 28 нп від 5'-кінця кодувальної ділянки, а також мотиви GC та C в позиціях – 12 нп та – 1 нп, відповідно (Douet and Tourmente, 2007). АТ-багатий елемент в позиції – 28 присутній в МГС представників кількох родин дводольних рослин (Baum et al., 2003; Singh and Ahuja, 2006; Tynkevich and Volkov, 2014; Volkov et al., 2017).

Проте, у *Ph. pratense* у цій позиції виявлено лише вкорочений мотив АТАА, який зустрічається і в інших злакових (Ishchenko et al., 2018; Volkov and Panchuk, 2014). Це може свідчити про різницю у ініціації транскрипції РНК-полімерази III у дво- та однодольних рослин.

Що стосується інших елементів зовнішнього промотора, то консервативні мотив GC та нуклеотид С знайдено у *Ph. pratense* в позиціях – 15 та – 1 нп, відповідно. Таке розташування динуклеотиду GC спостерігається вперше для представників родини Poaceae.

Аналіз отриманих послідовностей показав, що безпосередньо після кодувальної ділянки на початку МГС знаходиться Т-багатий мотив, який, імовірно, залучений до термінації транскрипції 5S рДНК. У двох сиквенованих клонах Phpra 1 та Phpra 3 цей мотив відрізняється за довжиною на одну нуклеотидну пару. Крім того, у МГС *Ph. pratense* на відстані 31 нп від потенційного термінатора наявний ще один оліго-Т мотив (рис. 1, 3). Можливо, цей мотив має функцію додаткового сайту термінації транскрипції.

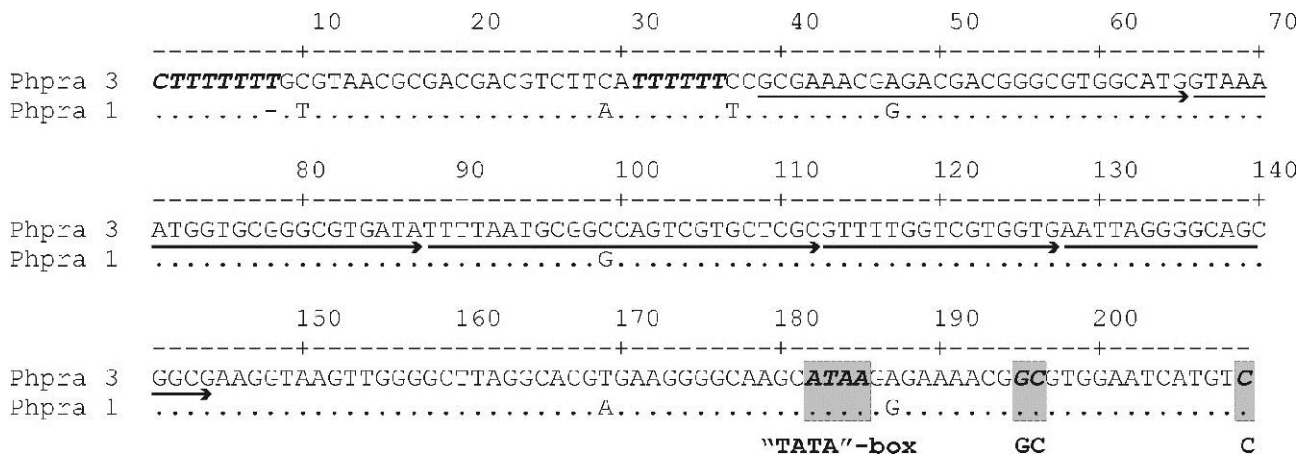


Рис. 1. Структурна організація МГС 5S рДНК *Phleum pratense*.

Fig. 1. Structural organization of 5S rDNA IGS of *Phleum pratense*.

Примітки: Жирним курсивом виділено оліго-Т послідовність потенційного термінатора та передбачувані зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III. Стрілками відмічено розташування повторюваних елементів. Скорочення назв клонів та їх характеристики наведено у табл. 1.

Note: the oligo- T sequence of the putative terminator and the elements of the external promoter of RNA polymerase III are shown in bold italic. Arrows indicate the location of subrepeats. The abbreviation of clone names and their characteristics are shown in the table. 1.

Consensus	GTTWAATGG--TGACGGGC----GTGG-ATG	(24 нп)
39	.CGA..C..GAC.....-...-...	65 (26 нп)
66	..AA.....-...-...-...-...A	87 (22 нп)
88	T..T..-...-...-...AGTC...CTCGC	112 (25 нп)
113	...T--...-...-...G-...-...-...	127 (15 нп)
128	----...-...-...G....AGCG.C.	144 (17 нп)

Рис. 2. Порівняння субповторів у МГС 5S рДНК *Phleum pratense*.

Fig. 2. Comparison of the subrepeats located in 5S rDNA IGS of *Phleum pratense*.

Висновки. У геномі *Ph. pratense* виявлений тільки один варіант повторюваної одиниці 5S рДНК із довжинами кодувальної ділянки та МГС 120 та 209 нп, відповідно. Центральна частина МГС складається з п'яти тандемно організованих дивергованих субповторів. На початку МГС присутня оліго-Т послідовність термінатора транскрипції РНК- полімерази III. Також у МГС у позиціях – 28, – 15 та – 1 виявлено консервативні мотиви АТАА, GC та С, які відповідають потенційним елементам зовнішнього промотора 5S рДНК.

Подяка. Автори висловлюють подяку проф. Р.А. Волкову (кафедра молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету) за участь у обговоренні отриманих результатів.

Список літератури:

1. Русак О.О., Петрашук В.І., Панчук І.І., Волков Р.А. Молекулярна організація 5S рДНК двох українських популяцій явора (*Acer pseudoplatanus*) // 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. Baum, B. R., Bailey, L. G., Johnson, D. A., Agafonov, A. V. Molecular diversity of the 5S rDNA units in the *Elymus dahuricus* complex (Poaceae: Triticeae) supports the genomic constitution of St, Y, and H haplomes // Can. J. of Bot. - 2003. - Vol. 81, No 11. - P. 1091-1103. doi:10.1139/b03- 102
7. Baum, B.R., Bailey, L.G., Belyayev, A., Raskina, O., and Nevo, E., 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. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Fulnecek J., Lim K.Y., Leitch A.R. et al. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species // Heredity. - 2002. - Vol. 88. - P. 19-25. doi: 10.1038/sj.hdy.6800001.
12. 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
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Poczai P., Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects // Mol. Biol. Rep. - 2010. - Vol. 37. - P. 1897-1912.
17. 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
18. 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.
19. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning - New York: Cold Spring Harbor Lab. - 1989. - 1626 p.
20. 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. 117-37. doi: 10.1111/jse.12150/epdf.
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. doi: 10.1139/g05- 065.
22. 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.
23. 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. - 2014. - Vol. 12, No. 1. - P. 3-11.

24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
- References:**
1. Rusak OO, Petrashchuk VI, Panchuk II, Volkov RA. 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; 14(2): 216-220.
 2. Tynkevich YuO, Volkov RA Novel structural class of 5S rDNA of *Rosa wichurana* Crep. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2014; 5:143-148.
 3. Tynkevich YO, Nevelska AO, Chorney II, Volkov RA. Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine.* 2015; 13(1): 81-87.
 4. Shelyfist AYe, Tynkevich YuO, Volkov RA. Molecular organization of 5S rDNA *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine.* 2018;16(1): 61-68.
 5. Altschul S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389
 6. Baum B, Bailey L, Johnson D, Agafonov A. Molecular diversity of the 5S rDNA units in the *Elymus dahuricus* complex (Poaceae: Triticeae) supports the genomic constitution of St, Y, and H haplomes. *Canadian Journal of Botany.* 2003;81(11):1091-1103. doi:10.1139/b03-102
 7. Baum B, Bailey L, Belyayev A, Raskina O, Nevo E. 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; 47 (3):590-599. doi:10.1139/g03-146
 8. Cloix C, Tutois S, Mathieu O, Cuveillier C, Espagnol MC, Picard G, Tourmente S. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genome Res.* 2000; 10: 679-690.
 9. Denk T, Grimm G. The oaks of western Eurasia: Traditional classifications and evidence from two nuclear markers. *Taxon.* 2010; 59 (2): 351-366.
 10. Douet J, Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity.* 2007; 99(1): 5-13. doi:10.1038/sj.hdy.6800964
 11. Fulnecek J, Lim K.Y, Leitch AR et al. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity.* 2002; 88: 19-25. doi: 10.1038/sj.hdy.6800001
 12. Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 1992; 8: 189-191. doi: 10.1093/bioinformatics/8.2.189
 13. Ishchenko O, Panchuk I, Andreev I, Kunakh V, Volkov R. Molecular Organization of 5S Ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytology and Genetics.* 2018; 52 (6): 416-421. doi:10.3103/s0095452718060105
 14. Layat E, Saez- Vasquez J, Tourmente S. Regulation of Pol I- Transcribed 45S rDNA and Pol III- Transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology.* 2011;53 (2): 267-276. doi:10.1093/pcp/pcr177
 15. Peng Y, Wei Y, Baum B, Zheng Y. Molecular diversity of the 5S rRNA gene and genomic relationships in the genus *Avena* (Poaceae: Aveneae). *Genome.* 2008;51 (2): 137-154. doi:10.1139/g07-111
 16. Poczai P, Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Mol. Biol. Rep.* 2010;37: 1897- 1912.
 17. Rogers S, Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol.* 1985; 5 (2): 69-76. doi:10.1007/bf00020088
 18. Röser M, Winterfeld G, Grebenstein B, Hemleben V. Molecular Diversity and Physical Mapping of 5S rDNA in Wild and Cultivated Oat Grasses (Poaceae: Aveneae). *Mol Phylogenet Evol.* 2001; 21 (2): 198-217. doi:10.1006/mpev.2001.1003
 19. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Lab. 1989.
 20. Soreng RJ, Peterson PM, Romschenko K et al. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *J. Syst. Evol.* 2015; 53 (2): 117-137. doi: 10.1111/jse.12150/epdf
 21. Singh D, Ahuja P. 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification. *Genome.* 2006; 49 (1): 91-96. doi:10.1139/g05-065
 22. Tynkevich Y, Volkov R. Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytology and Genetics.* 2014; 48 (1): 1-6. doi:10.3103/s0095452714010095
 23. Volkov AR., Panchuk II. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders.* 2014; 12 (1): 3-11.
 24. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV et al. Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* 2017; 17 (1): 1-15. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6
 25. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk LG, Borisjuk MV. Plant rDNA: Organization, evolution and using. *Cytol. Genet.* 2003; 37 (1): 68-72.

26. Volkov R, Zanke C, Panchuk I, Hemleben V. Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny

and breeding. *Theoretical and Applied Genetics*. 200; 103 (8): 1273-1282. doi:10.1007/s001220100670

5S RDNA OF TIMOTHY-GRASS *PHLEUM PRATENSE* L.

O. O. Ishchenko, T. O. Derevenko, I. I. Panchuk

Genomic regions encoding 5S ribosomal RNA (5S rDNA) are necessary for ribosomal biogenesis. Tandemly arranged repeated units of 5S rDNA found in the genomes of all eukaryotes represent a universal model for studying the evolution of repeated sequences. Each of the 5S rDNA repeated units consists of the evolutionarily conserved sequence coding for 5S ribosomal RNA (5S rRNA) and more rapidly evolving intergenic spacer region (IGS). The sequence elements of the external promoter and terminator of RNA polymerase III, which are required for transcription of 5S rDNA, are located in the IGS. However, these motifs may vary in different families of angiosperms.

The family Poaceae appears to be an attractive group of plants for the comparative study of 5S rDNA. However, for this family, the 5S rDNA still remains poorly studied. In particular, nothing is known about the molecular organization of 5S rDNA in such a widespread and economically important genus as *Phleum*. Accordingly, it was decided to clone, sequence, and analyze the structure of the 5S rDNA repeated unit of the timothy-grass *Ph. pratense* L. It was shown that only one variant of the 5S rDNA repeated unit with 120 bp-long coding region and 209 bp-long IGS is present in the genome of this species. The central part of the IGS consists of five tandemly arranged diverged subrepeats, which differ by nucleotide substitutions and small deletions/insertions. At the beginning of the IGS, an oligo- T sequence of the transcription terminator of RNA polymerase III is present. The conservative motives ATAA, GC and C, which represent the putative elements of the external 5S rDNA promoter, were detected in the IGS 28, 15 and 1 bp upstream of the coding region. A comparative analysis of the obtained sequences shows that the location of the GC motive 15 bp upstream of the coding region is not found in the previously investigated species of angiosperms, i.e., it appears to be unique. The obtained results indicate the difference in the RNA polymerase III transcription initiation in dicots and monocots.

Keywords: 5S rDNA, intergenic spacer region, molecular evolution, repeated sequences, *Phleum pratense*, Poaceae.

Отримано редколегією 10.12.2018