

ТИНКЕВИЧ Ю. О., БУШИЛА К. Д., ВОЛКОВ Р. А.✉

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

✉ r.volkov@chnu.edu.ua, (0372) 58-47-93

ОРГАНІЗАЦІЯ МІЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА 5S рДНК *QUERCUS RUBRA* L.
ТА ЙОГО СПОРІДНЕНІСТЬ З УКРАЇНСЬКИМИ ВИДАМИ РОДУ *QUERCUS*

Мета. *Quercus rubra* L. – представник північноамериканської секції *Lobatae*, який натуралізувався в Україні та подекуди стає інвазивним видом. Тому, з'ясування його спорідненості з українськими видами секції *Quercus* є актуальним для оцінки можливості формування міжвидових гібридів. Міжгенний спейсер 5S рДНК (IGS) являє собою зручний молекулярний маркер для вирішення цього питання. **Методи.** Виділення ДНК, ПЛР-ампліфікація, клонування та сиквенування. **Результати.** Клоновано та сиквенувано послідовності IGS *Q. rubra*. З'ясовано, що після дивергенції секцій *Lobatae* та *Quercus* послідовності IGS еволюціонували переважно шляхом накопичення нуклеотидних замін. Виявлено високий рівень подібності IGS для видів у межах секцій *Lobatae* та *Quercus*, тоді як генетичні дистанції між представниками цих двох секцій значно більші. **Висновки.** Велика кількість нуклеотидних замін вказує на значну генетичну дистанцію між секціями *Lobatae* і *Quercus* та ставить під сумнів можливість спонтанної гібридизації між *Q. rubra* та аборигенними для України видами секції *Quercus*. Водночас висока генетична спорідненість між іншим північноамериканським видом (*Q. lobata*) та українськими «білими дубами» показує, що інтродукція представників цієї групи може створити умови для їхньої спонтанної гібридизації з місцевими видами, що може бути небажаним для збереження природних лісостепових угруповань України. Особливості будови IGS 5S рДНК можуть бути використані для молекулярної паспортизації видів роду *Quercus* та ідентифікації міжвидових гібридів.

Ключові слова: 5S рДНК, молекулярна еволюція, *Quercus*, *Lobatae*.

Quercus rubra – представник ендемічної для американського континенту секції *Lobatae* (підвид *Quercus*), яка має також тривіальну назву «червоні дуби» завдяки характерному кольору листя наприкінці вегетативного сезону.

Цей вид був інтродукований до Європи у першій половині 18 ст. і з часом натуралізувався по всій західній та центральній Європі [1]. Місцями спостерігається інвазія *Q. rubra* у природні фітоценози [2]. У зв'язку з цим постає питання про можливість гібридизації *Q. rubra* з місцевими видами роду *Quercus* та міжвидове перенесення генів.

В Україні розповсюджені три аборигенні види дубів [3], які близько споріднені між собою та належать до секції *Quercus* (так звані «білі дуби»). З них лише дуб черешчатий, *Q. Robur* трапляється на більшій частині території країни. Хоча українські види дубів відносяться до того ж підроду, що і *Q. rubra* [4], вони вважаються генетично віддаленими. Немає жодних відомостей про можливість їх схрещування у природі, проте є поодинокі згадки про успішні спроби штучної гібридизації між *Q. rubra* та деякими представниками секції *Quercus*, зокрема і *Q. robur* [5–7]. Однак згадані дослідження не були опубліковані у міжнародних виданнях, а гібридна природа отриманих форм не була підтверджена генетичними методами, що зумовлює певне скептичне ставлення до них [8]. Теоретична можливість гібридизації видів із різних секцій залишається недостатньо дослідженою, хоча відомо, що всередині груп «червоних дубів» та «білих дубів» міжвидова гібридизація є надзвичайно поширеною [8]. Для перевірки ідеї про можливість гібридизації між представниками секцій *Lobatae* та *Quercus* необхідно оцінити генетичну дистанцію між ними з використанням молекулярних методів та розробити молекулярні маркери для виявлення гібридних форм. Ці цілі можуть бути досягнуті шляхом дослідження молекулярної організації 5S рДНК, тобто ділянок геному, які кодують 5S рибосому РНК.

Особливістю генів 5S рРНК є їхня багатокопійність з утворенням тамдемо організованих кластерів у ядерному геномі. Кодувальна ділянка 5S рДНК еволюційно консервативна,

© ТИНКЕВИЧ Ю. О., БУШИЛА К. Д., ВОЛКОВ Р. А.

що необхідно для збереження функції 5S рДНК у складі рибосоми [9]. Розділяє сусідні кодувальні ділянки міжгенний спейсер (intergenic spacer, IGS), який є еволюційно мінливим, оскільки він не транскрибується і більша його частина не виконує регуляторних функцій [10]. Завдяки цим властивостям 5S рДНК є зручним інструментом для вивчення закономірностей молекулярної еволюції та з'ясування генетичних дистанцій між близько спорідненими таксонами. Раніше ефективність використання цієї ділянки у таксономічних дослідженнях було успішно представлено для родів *Solanum* [11], *Acer* [12, 13], *Lathyrus* [14], *Vinga* [15], триб *Roeae* [16–18], *Helieae* [19] та інших груп Покритонасінних рослин. 5S рДНК була також використана у таксономічних дослідженнях роду *Quercus*, проте, переважно для західноєвропейських представників секцій *Quercus*, *Cerris* та *Illex* [20, 21]. Для секції *Lobatae* організація 5S рДНК була описана лише для двох видів – *Q. texana* та *Q. imbricaria* [22, 23]. У пропонованій роботі ми аналізуємо молекулярну організацію IGS 5S рДНК у ще одного представника цієї секції – *Q. rubra*.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували гербаризовані зразки *Q. rubra* з Ботанічного саду Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Сумарну ДНК екстрагували за модифікованою методикою з цетавлоном [24, 25]. Для ампліфікації повторювальної ділянки 5S рДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували пару праймерів 5S-L (5'-GCG AGA GTA GTA СТА GGA TGC GTG AC-3') та 5S-R (5'-GCT ТАА СТТ CGG AGT TCT GAT GGG A-3'), які комплементарні до кодувальної ділянки [11, 22]. Застосування цих праймерів забезпечує ампліфікацію повного міжгенного спейсера та фланкуючих ділянок кодувальної послідовності 5S рДНК.

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, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази та денатурація ДНК – 95°C, 12 хв; (2) денатурація ДНК – 95°C, 20 с; (3) гібридизація праймерів

– 61°C, 30 с; (4) синтез ДНК – 72°C, 30 с; (5) завершення ампліфікації – 72°C, 7 хв; припинення реакції – 4°C; загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Результати ампліфікації перевіряли за допомогою електрофорезу у 2 % агарозному гелі.

Продукти ПЛР лігували у плазмідний вектор pJET 1.2/blunt, використовуючи набір реактивів CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Очищену лігазну суміш трансформували в компетентні клітини *E. coli* лінії XL1-Blue методом електропорації з використанням приладу *E. coli* Pulser (BioRad, США). Колонії, що містили рекомбінантні плазмиди, виявляли за резистентністю до ампіциліну. Наявність вставки перевіряли, застосовуючи ПЛР із праймерами Forward і Reverse pJET 1.2, сайти гібридизації яких знаходяться в плазмідній ДНК по обидва боки від полілінкера. Рекомбінантні плазмиди з позитивних клонів виділяли методом лужного лізису. Продукти ампліфікації, що містили вставки 5S рДНК, сиквенували на фірмі LGC Genomics (Німеччина).

Первинну обробку нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR. Пошук гомологічних послідовностей здійснювали за допомогою програми BLAST [26]. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили методом Clustal W [27]. Філогенетичну дендрограму будували за допомогою плагіна RAxML [28] у середовищі програми Geneious Prime 2019.0.4.

Результати та обговорення

За результатами скринінгу бактерій-трансформантів було ідентифіковано сім рекомбінантних клонів 5S ДНК, два з яких було відібрано для сиквенування. Аналіз отриманих послідовностей показав наявність у них повнорозмірного IGS 5S рДНК, фланкованого з обох боків фрагментами кодувальної ділянки (включно з праймерами, використаними для ампліфікації).

Для порівняння IGS *Q. rubra* з відповідними ділянками геному видів роду *Quercus*, які представлені в українській флорі, був проведений пошук у міжнародній базі даних Genbank та знайдено послідовності IGS для *Q. robur*, *Q. pubescens* та *Q. petraea* (табл. 1).

Таблиця 1. Характеристика IGS 5S рДНК видів роду *Quercus*

Вид		Клон / фрагмент ДНК		IGS		Посилання
Назва	Розповсюдження	Назва	GenBank Acc. No	Довжина, нп	Вміст GC-пар, %	
<i>Q. rubra</i>	СПА	Qurub3	–	219	47,5	Ця стаття
		Qurub7	–	218	47,2	
<i>Q. texana</i>	СПА	Qutex4	MN124992	217	47,9	[22]
		Qutex6	MN124993	217	47,0	
<i>Q. imbricaria</i>	СПА	Quimb1	–	217	46,1	[23]
<i>Q. lobata</i>	ЗПА	Qulob (SW786 ch. 5, 33816993 - 33817322 bp)	LRBV020000 05.1	219	50,7	[22, 29]
<i>Q. robur</i>	ЗЄ	SQroALP12e	AJ245083.1	230	52,2	Trontin 1999, unpublished
<i>Q. pubescens</i>	ЗЄ	vi10s06	FM243349.1	230	52,6	[20]
<i>Q. petraea</i>	ЗЄ	SQpe390096-3b	AJ245091.1	230	52,6	Trontin 1999, unpublished

Примітки: ЗЄ – західна Євразія, ЗПА – західна Північна Америка, СПА – східна Північна Америка.

Вирівнювання послідовностей IGS представників секцій *Quercus* та *Lobatae* було проведено за методом Clustal W. Загальна довжина вирівнювання складає 230 нп (рис. 1). Порівняльний аналіз показує, що між IGS видів, які відносяться до однієї секції, відмінності обмежуються поодинокими нуклеотидними замінами та подекуди однонуклеотидними інделами. Винятком є лише північноамериканський представник секції *Quercus* – *Q. lobata*, в якого знайдена 12-ти нуклеотидна делеція на початку IGS, що відрізняє цю послідовність від усіх інших. У водночас між послідовностями, що належать видам із різних секцій, відмінності є значно більші. Особливо багато нуклеотидних замін та дві олігонуклеотидні делеції виявлено у центральній частині спейсера, між позиціями 70 та 160 нп.

На 5' та 3' кінцях IGS ідентифіковано потенційні регуляторні мотиви, відповідно термінації та ініціації транскрипції для РНК-полімерази III [30, 31]. Раніше подібні елементи було знайдено також у кількох інших групах Покритонасінних [14, 18, 32, 33]. Нуклеотидна послідовність таких мотивів у *Q. rubra* є типовою для роду *Quercus* [22]. Очевидно, що саме присутність названих функціонально важливих елементів зумовлює підтримання вищого рівня

еволюційної консервативності цих ділянок (порівняно з центральною частиною IGS).

На основі вирівнювання був обрахований відсоток подібності між послідовностями IGS (табл. 2). Як можна побачити, цей показник є значно вищим для видів, які відносяться до однієї секції (у порівнянні з його значеннями між послідовностями IGS видів з двох різних секцій). Так, всередині секцій *Lobatae* та *Quercus* значення відсотка подібності знаходяться в межах від 94,5–99,1 % та 97,8–99,1 % відповідно. Водночас між послідовностями з двох різних секцій цей показник знаходиться в межах від 67,3 до 71,0 %.

Варто відмітити, що достатньо низькі значення подібності між послідовностями IGS видів, що відносяться до секцій *Lobatae* та *Quercus*, пов'язані в першу чергу з великою кількістю точкових нуклеотидних замін, для накопичення яких був потрібен тривалий час незалежної еволюції цих таксонів. Це узгоджується із викопними даними, на основі яких вважається, що дивергенція таких двох груп могла відбутися вже в ранньому еоцені.

Вирівнювання послідовностей IGS використано для побудови філодендрограми, що відображає генетичні дистанції між проаналізованими видами дубів (рис. 2).

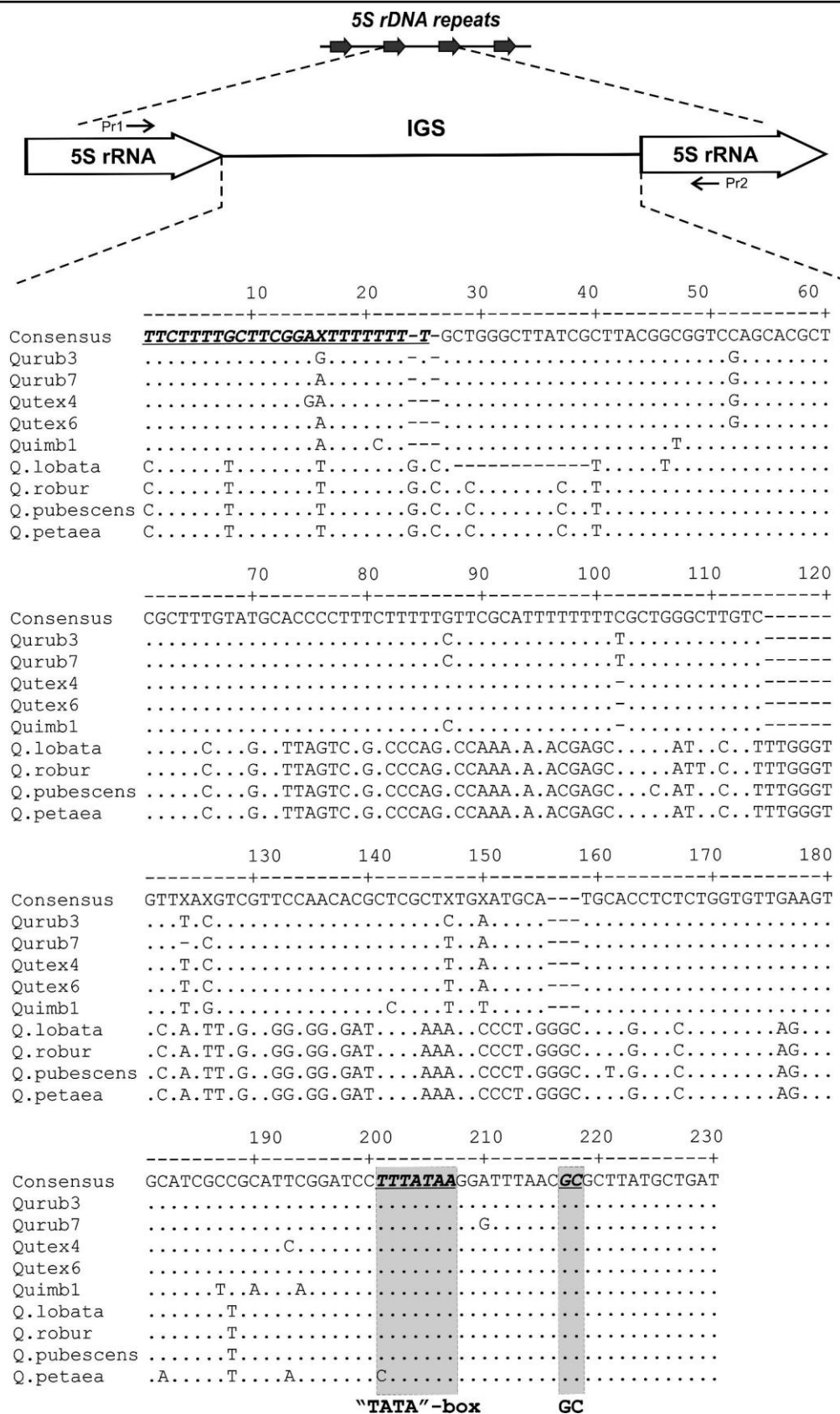


Рис. 1. Структурна організація IGS 5S рДНК видів роду *Quercus*. Pr1 та Pr2 – праймери 5S-L та 5S-R відповідно. Виділено потенційні зовнішні елементи промотора; підкресленим курсивом позначено оліго-Т послідовність термінатора. Характеристики використаних для вирівнювання клонів наведено у табл. 1.

Таблиця 2. Рівень подібності (%) IGS 5S рДНК видів роду *Quercus*

Вид - клон	Qurub3	Qurub7	Qutex4	Qutex6	Quimb1	<i>Q. lobata</i>	<i>Q. robur</i>	<i>Q. pubescens</i>	<i>Q. petraea</i>
Qurub3	100,0	98,6	97,7	98,6	94,9	69,1	69,9	69,4	68,9
Qurub7		100,0	98,1	99,1	95,4	68,9	69,7	69,3	68,8
Qutex4			100,0	99,1	94,5	69,3	70,0	69,6	69,6
Qutex6				100,0	95,4	70,2	71,0	70,5	70,0
Quimb1					100,0	67,3	68,2	67,7	67,3
<i>Q. lobata</i>						100,0	99,1	98,6	98,2
<i>Q. robur</i>							100,0	98,7	98,3
<i>Q. pubescens</i>								100,0	97,8
<i>Q. petraea</i>									100,0

Примітка. На сірому фоні позначено рівень подібності між видами з однієї секції.

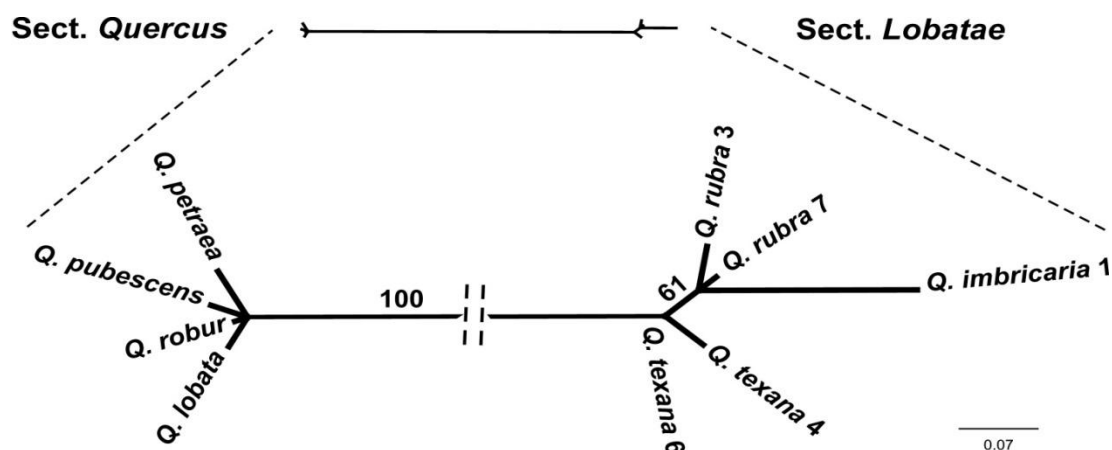


Рис. 2. Філодендрограма отримана під час порівняння послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Quercus* методом максимальної правдоподібності з використанням GTR моделі заміщення. Цифри біля вузлів відповідають бутстреп-підтримці, яка розрахована у відсотках для 1000 реплікацій.

Видно, що в межах секцій генетичні дистанції є мінімальними, що свідчить про високу спорідненість видів та пояснює легкість процесів міжвидової гібридизації як між «червоними», так і між «білими» дубами. На противагу цьому, генетична дистанція між секціями є набагато більшою. Хоча базове хромосомне число у всіх представників роду є однаковим ($x=12$ [34]), накопичення нуклеотидних змін може призводити до того, що хромосоми видів з різних секцій стають гомеологічними. Тому це має ускладнювати проходження мейозу у міжсекційних гібридів або навіть унеможливити

його. Таке припущення добре узгоджується із відсутністю достовірних даних про успішну гібридизацію в природі між представниками секцій *Lobatae* та *Quercus*, хоча їх ареали у Північній Америці дуже часто перекриваються [4].

Висновки

Після дивергенції секцій *Lobatae* та *Quercus* послідовності IGS 5S рДНК еволюціонували переважно шляхом накопичення точкових нуклеотидних змін. Велика кількість таких змін вказує на значну генетичну дистанцію між цими секціями та ставить під сумнів можливість

спонтанної гібридизації між *Q. rubra* та аборигенними для України видами секції *Quercus*. Водночас висока генетична спорідненість між іншим північноамериканським видом (*Q. lobata*) та українськими «білими дубами» показує, що інтродукція представників цієї групи може створити умови для їхньої спонтанної гібриди-

зації з місцевими видами, що може бути небезпечним для збереження природних лісостепових угруповань України. Особливості будови IGS 5S рДНК видів роду *Quercus* можуть бути використані для молекулярної паспортизації видів та ідентифікації міжвидових гібридів.

References

- Magni Diaz, C.R. Reconstitution de l'introduction de *Quercus rubra* L. en Europe conséquences génétiques dans les populations allochtones. PhD Thesis. ENGREF, Paris, France. 2005. 419 p.
- Woziwodza B., Kopeć D., Witkowski J. The negative impact of intentionally introduced *Quercus rubra* L. on a forest community. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2014. Vol. 83 (1). P. 39–49. doi: 10.5586/asbp.2013.035.
- Mosyakin S.L., Fedoronchuk M.M. Vascular plants of Ukraine: a nomenclatural checklist. Kiev: M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, 2019. 345 p. doi: 10.13140/2.1.2985.0409
- Denk T., Grimm G.W., Manos P.S., Deng M., Hipp A.L. An updated infrageneric classification of the oaks: review of previous taxonomic schemes and synthesis of evolutionary patterns, *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.* Cham: Springer. 2017. P. 13–38. doi: 10.1007/978-3-319-69099-5_2.
- Piatnitskiy S.S. Otdalennaia gibridizatsiia dubov: Dis. doktora s.-g. nauk: 06.03.01. KhSKhI. Khar'kov, 1948. 179 p. [in Russian] / Пятницький С.С. Отдаленная гибридизация дубов: Дис. доктора с.-г. наук: 06.03.01. ХСХИ. Харьков, 1948. 179 с.
- Badalov P.P., Los' S.A. Vnesok S.S. P'iatnits'kogo u rozvitok lisovoi selektsii. *Lisivnitstvo i agrolisomeliioratsiia: Zb. nauk. pr. Kharkiv: UkrNDILGA*, 2009. Vol. 116. P. 3–8. [in Ukrainian] / Бадалов П.П., Лось С.А. Внесок С.С. П'ятницького у розвиток лісової селекції. *Лісівництво і агролісомеліорація: Зб. наук. пр. Харків: УкрНДІЛГА*, 2009. Вип. 116. С. 3–8.
- Iozus A.P., Morozova E.V., Makarov V.M. Osnovnye rezultaty selektsii i gibridizatsii listvennykh drevesnykh porod dlia zashchitnogo lesorazvedeniia. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2014. Vol. 11 (4). P. 613–617. [in Russian] / Иозус А.П., Морозова Е.В., Макаров В.М. Основные результаты селекции и гибридизации лиственных древесных пород для защитного лесоразведения. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014. Т. 11, № 4. С. 613–617.
- Rushton B.S. Natural hybridization within the genus *Quercus* L. *Ann. For. Sci.* 1993. Vol. 50. P. 73–90.
- Barciszewska M.Z., Szymański M., Erdmann V.A., Barciszewski J. Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim. Polon.* 2001. Vol. 48 (1). P. 191–198.
- Cloix C., Tutois S. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genom Res.* 2000. Vol. 10. P. 679–690. doi: 10.1101/gr.10.5.679.
- 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 (8). P. 1273–1282. doi: 10.1007/s001220100670.
- Rusak I.I., Petrashchuk V.I., Panchuk I.I., Volkov R.A. Molecular organization of 5S rDNA in two Ukrainian populations of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2016. Vol. 14 (2). P. 216–220. doi: 10.7124/visnyk.utgis.14.2.691. [in Ukrainian] / Русак О.О., Петрашчук 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. Т. 14, № 2. С. 216–220. doi: 10.7124/visnyk.utgis.14.2.691.
- Panchuk I.I., Kasianchuk R.M., Volkov R.A. Subrepeats in 5S rDNAs as a molecular marker in *Acer platanoides* L. populations. *Factors of experim. evol. organisms*. 2019. Vol. 25. P. 80–85. doi: 10.7124/FEEO.v25.1143. [in Ukrainian] / Панчук І.І., Касіянчук Р.М., Волков Р.А. Субповтори у 5S рДНК як молекулярний маркер у популяціях *Acer platanoides* L. *Фактори експерим. евол. організмів* 2019. Т. 25. С. 80–85. doi: 10.7124/FEEO.v25.1143.
- Tynkevich, Y.O., Nevelska A.O., Chorney I.I., Volkov R.A. Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2015. Vol. 13 (1). P. 81–87. [in Ukrainian] / Тинкевич Ю.О., Невельська А.О., Чорней І.І., Волков Р.А. Організація та мінливість міжгенного спейсера 5S рДНК *Lathyrus venetus*. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2015. Т. 13 (1). С. 81–87.
- Saini A., Jawali N. Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* 2009. Vol. 280 (3–4). P. 187. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4.
- Volkov A.R., Panchuk I.I. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2014. Vol. 12 (1). P. 3–11.
- Ishchenko O.O., Derevenko T.O. Panchuk I.I. 5S rDNA of Timothy-grass *Phleum pratense* L., *Sci. Herald of Chernivtsy University. Biology (Biological Systems)*. 2018. Vol. 10 (2). P. 107–112. [in Ukrainian] / Іщенко О.О., Деревенко Т.О., Панчук І.І. 5S рДНК тимопіївки лучної *Phleum pratense* L., *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*. 2018. Т. 10, № 2. С. 107–112.
- Ishchenko O.O., Panchuk I.I. Molecular organization of 5S rDNA of perennial ryegrass *Lolium perenne* L., *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2018. Vol. 16 (2), P. 166–173. doi: 10.7124/visnyk.utgis.16.2.1054. [in Ukrainian] / Іщенко О.О., Панчук І.І. Молекулярна організація 5S рДНК пажитниці багаторічної *Lolium perenne* L. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2018. Т. 16, № 2). С. 166–173. doi: 10.7124/visnyk.utgis.16.2.1054.

19. Calió M.F., Lepis K.B., Pirani J.R., Struwe L., Phylogeny of Helieae (Gentianaceae): Resolving taxonomic chaos in a Neotropical clade. *Mol. Phylogen. Evol.* 2017 Vol. 106, P. 192–208. doi: 10.1016/j.ympev.2016.09.013.
20. Denk T., Grimm G.W. The oaks of western Eurasia: traditional classifications and evidence from two nuclear markers. *Taxon.* 2010. Vol. 59 (2). P. 351–366. doi: 10.1002/tax.592002.
21. Simeone M.C., Cardoni S., Piredda R., Imperatori F., Avishai M., Grimm G.W., Denk T. Comparative systematics and phylogeography of *Quercus* section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation. *Peer. J.* 2018. Vol. 6. P. e5793. doi: 10.7717/peerj.5793.
22. Tynkevich Y.O., Volkov R.A. 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol. Genet.* 2019. Vol. 53 (6). P. 26–35. doi: 10.3103/S0095452719060100.
23. Stratiichuk A.S., Derevenko T.O., Tynkevich Y.O. Organization of 5S rDNA repeated unit of *Quercus imbricaria* Michx. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2019. Vol. 17 (2). P. 179–186. doi: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1219. [in Ukrainian] / Стратійчук А.С., Деревенко Т.О., Тинкевич Ю.О. Організація повторюваної ділянки 5S рДНК *Quercus imbricaria* Michx. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* 2019. Т. 17, № 2. С. 179–186. doi: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1219.
24. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1997. Vol. 15 (1). P. 8–15. doi: 10.1007/BF02772108.
25. Panchuk I.I., Volkov R.A. *Praktykum z molekuliarnoi henetyky.* Chernivtsi: Ruta. 2007. 120 с. [in Ukrainian] / Панчук І.І., Волков Р.А. *Практикум з молекулярної генетики.* Чернівці: Рута. 2007. 120 с.
26. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer 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 (17). P. 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
27. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 1994. Vol. 22. P. 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
28. Stamatakis A. RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014. Vol. 30 (9). P. 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
29. Sork V.L., Squire K., Gugger P.F., Steele S.E., Levy E.D., Eckert A.J. Landscape genomic analysis of candidate genes for climate adaptation in a California endemic oak, *Quercus lobata*. *Am. J. Bot.* 2016. Vol. 103 (1). P. 33–46. doi: 10.1007/s11295-016-0975-1
30. 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. doi: org/10.1038/sj.hdy.6800964.
31. Simon L., Rabanal F.A., Dubos T., Oliver C., Lauber D., Poulet A., Vogt A., Mandlbauer A., Le Goff S., Sommer A., Duborjal H., Tatout C., Probst A.V. Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res.* 2018. Vol. 46 (6). P. 3019–3033. doi: 10.1093/nar/gky163.
32. Tynkevich Y.O., Volkov R.A. Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* 2014, Vol. 48 (1). P. 1–6. doi: 10.3103/S0095452714010095.
33. Tynkevich Y.O., Volkov R.A. Novel structural class of 5S rDNA of *Rosa wichurana* Среп. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2014. (5). P. 143–148. [in Ukrainian] / Тинкевич Ю.О., Волков Р.А. Новий структурний клас 5S рДНК *Rosa wichurana* Среп. *Доповіді Національної академії наук України.* 2014. (5). С. 143–148.
34. Ohri D., Ahuja M.R. Giemsa C-banded karyotype in *Quercus* L. (Oak). *Silvae Genet.* 1990. Vol. 39. P. 216–219.

TYNKEVICH Y.O., BUSHYLA K.D., VOLKOV R.A.

Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi, Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynski str., 2, e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

ORGANIZATION OF THE 5S rDNA INTERGENIC SPACER OF *QUERCUS RUBRA* L. AND ITS RELATIONSHIP TO THE UKRAINIAN *QUERCUS* SPECIES

Aim. *Quercus rubra* L. is a representative of the North American section *Lobatae*, which has naturalized in Ukraine and becomes an invasive species in some places. Accordingly, elucidation of its relationship with the Ukrainian species of section *Quercus* is relevant to assess the possibility of interspecific hybridization. The 5S rDNA intergenic spacer (IGS) represents a convenient molecular marker to address this question. **Methods.** DNA isolation, PCR amplification, cloning and sequencing. **Results.** The IGS of *Q. rubra* was cloned and sequenced. It was shown that after the divergence of the *Lobatae* and *Quercus* sections, the IGS sequences evolved mainly by accumulation of nucleotide substitutions. A high level of IGS similarity was found for species within the *Labatae* and *Quercus* sections, while the genetic distances between the representatives of these two sections appeared significantly higher. **Conclusions.** The high level of nucleotide substitutions indicates a considerable genetic distance between the *Lobatae* and *Quercus* sections and calls into question the possibility of spontaneous hybridization between *Q. rubra* and Ukrainian native species of the section *Quercus*. At the same time, the close genetic relationship between other North American species, *Q. lobata* and Ukrainian "white oaks" indicate that introduction of representatives of this group may create conditions for their spontaneous crossing with the native species, which could be undesirable for the conservation of Ukraine's natural forest-steppe communities. Sequencing of the 5S rDNA IGS can be used for molecular genotyping of the *Quercus* species and for identification of interspecific hybrids.

Keywords: 5S rDNA, molecular evolution, *Quercus*, *Lobatae*.