

МЕЛЬНИК В. М.^{1✉}, АНДРЕЄВ І. О.¹, ВОЛКОВ Р. А.², КУНАХ В. А.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, ORCID: 0000-0002-0084-3142, 0000-0002-3706-8514, 0000-0002-9418-3172

² Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,

Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2, ORCID: 0000-0003-0673-2598

✉ v.m.melnyk@imbg.org.ua

МІЖГЕННИЙ СПЕЙСЕР 5S рДНК ДЕЯКИХ ВИДІВ СЕКЦІЙ *CRUCIATA* І *CHONDROPHYLLAE* ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ В ТАКСОНОМІЇ РОДУ *GENTIANA*

Мета. Ділянка міжгенного спейсера (МГС) 5S рДНК є зручним інструментом для з'ясування питань, пов'язаних із еволюцією геному і систематикою вищих рослин. **Мета.** Дослідження нуклеотидної послідовності МГС генів 5S рДНК деяких видів секцій *Cruciata* і *Chondrophyllae*, а також вивчення особливостей організації цієї ділянки шляхом порівняльного аналізу з іншими представниками роду *Gentiana*. **Методи.** Полімеразна ланцюгова реакція, клонування, секвенування, біоінформатичний аналіз. **Результати.** Визначено і проаналізовано нуклеотидну послідовність клонованих ділянок МГС видів *G. laciniata*, *G. cruciata* та *G. dahurica*. Встановлено наявність типових регуляторних елементів у ділянках термінатора і зовнішнього промотора гена 5S рДНК. На основі порівняльного аналізу виділено дві групи видів, які суттєво відрізняються за організацією цієї ділянки геному. Одна з них включає *G. asclepiadea* і види секцій *Gentiana*, *Ciminalis* і *Calathianae*, а друга – види секцій *Cruciata* і *Pneumonanthe*. *G. laciniata* (sect. *Chondrophyllae*) відрізняється за послідовністю МГС від видів обох груп. **Висновки.** Результати групування таксонів загалом узгоджуються із уявленнями про систематику роду і свідчать, що ділянка МГС 5S рДНК може бути зручним маркером для дослідження питань еволюції й систематики видів роду.

Ключові слова: *Gentiana*, міжгенний спейсер 5S рДНК, молекулярна організація, філогенія.

Секція *Cruciata* Gaudin – це одна з 15 секцій субкосмополітного роду *Gentiana* родини *Gentianaceae* [1]. Вона включає 21 вид рослин, поширених у помірній зоні Євразії, з центром найбільшого різноманіття в Західному Китаї і Гімалайському регіоні. З цих видів 16 зустріча-

ються в Китаї [1]. Найпоширеніший і єдиний європейський вид секції – *G. cruciata* зрідка знаходять у лісостеповій і степовій зонах України, часто – у Прикарпатті й у Криму [2].

Види секції є дуже подібними за анатомо-морфологічними і екологічними ознаками. Цитогенетичні дослідження представників секції показали, що основне хромосомне число в них становить 13 ($x = 13$) [3]. Це свідчить також і про цитогенетичну стабільність цієї секції. Переважна кількість видів є диплоїдами з $2n = 2x = 26$ включно із дослідженим нами *G. dahurica* (табл.). Деякі види є тетраплоїдами з $2n = 4x = 52$. Зокрема така кількість хромосом описана для *G. cruciata* (табл.) із різних частин ареалу, а також для *G. macrophylla*, *G. straminea*, *G. tibetica* і *G. waluiewii* [3, 4]. У *G. cruciata* знайдено лише тетраплоїдні рослини. Кілька інших тетраплоїдних видів є регіонально симпатричними з диплоїдними видами в Західному Китаї [3].

Секція *Chondrophyllae* Bunge включає 158 видів і представляє найбільшу секцію роду *Gentiana* L. Це субкосмополітна секція, яка має найбільше різноманіття в Азії (154 види), особливо в гірських районах Південно-Західного Китаю, де знайдено 88 видів [1].

В Європі поширені три види: *G. boryi* Boiss., *G. pyrenaica* L., *G. laciniata* [4]. Для *G. boryi* наводять хромосомні числа $2n = 20$ і 26; для *G. pyrenaica* – $2n = 26$ [5]. *G. boryi* Boiss. ендемічний для Іспанії, а *G. pyrenaica* L. знайдений у Східних Піренеях, Карпатах, Південно-Західній Болгарії і Західній Азії [1].

G. laciniata Kit. ex Kanitz. – східнокарпатський ендемічний високогірний вид [2]. Цей вид тривалий час вважався синонімом *G. pyrenaica*, до якого дуже подібний за анатомо-морфологічними ознаками [6]. Проте на сьогодні за даними The World Flora Online вважається

окремим видом [7]. Значення хромосомних чисел для *G. laciniata* в літературі відсутні. Ми припускаємо, що оскільки *G. laciniata* дуже близький до *G. pyrenaica*, то теж має хромосомне число $2n = 26$ (табл.).

Для європейських видів секції *Chondrophyllae* відомі два значення хромосомних наборів – $2n = 20$ і 26 , тоді як для інших (неєвропейських) видів секції – широкий діапазон диплоїдних наборів хромосом: $2n = 12, 14, 18, 20, 24, 26, 38, 40, 44, 48, 60, 96–98$ [4]. Це свідчить про каріотипову варіабельність її представників. Це також вказує на можливу штучність об'єднання видів з різними хромосомними числами в одну секцію. Тому обсяг цієї секції постійно переглядають і виділяють деякі таксоми в окремі секції [1, 8, 9].

Для систематики таких складних таксонів як рід *Gentiana*, доцільним є використання молекулярно-генетичних маркерів. Такі дослідження проводилися для видів роду *Gentiana*. Зокрема широкого використання набули хлоропластні послідовності та ділянки внутрішніх транскрибованих спейсерів (BTC) 35S рибосомної ДНК [10–12]. Проте, дані таких досліджень можуть давати суперечливі результати, що обумовлено значними відмінностями у швидкості еволюції цих ділянок геному. Залучення додаткових типів молекулярних маркерів, як, наприклад, ділянки міжгенного спейсера (МГС) 5S рДНК, може дозволити краще зрозуміти філогенію окремих таксонів роду *Gentiana*. На жаль, нуклеотидну послідовність МГС 5S рДНК наразі вивчено лише у деяких представників п'яти секцій (*Gentiana*, *Calathianae* Froel., *Ciminalis*, *Monopodiae* і *Pneumonanthe* (Gled.) Gaudin) [13–17]. МГС 5S рДНК видів секцій *Cruciata* і *Chondrophyllae* до цього не вивчався.

Метою роботи було дослідження нуклеотидної послідовності міжгенного спейсера генів 5S рДНК видів секцій *Cruciata* і *Chondrophyllae*, а також вивчення особливостей організації цієї ділянки шляхом порівняльного аналізу з іншими представниками роду *Gentiana*.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували рослини трьох видів тирличів – *G. dahurica* і *G. cruciata*, які відносять до секції *Cruciata*, а також *G. laciniata* із секції *Chondrophyllae*. Зразок *G. cruciata* взятий у природному заповіднику «Медобори» (Тернопільська обл., Україна). Зразок *G. dahurica* люб'язно наданий к. б. н.

Голубенко А. В. із колекції рослин Ботанічного саду ім. Академіка О. В. Фоміна КНУ. Зразок *G. laciniata* зібраний на горі Бребенескул (хребет Чорногора) у Карпатському біосферному заповіднику (Івано-Франківська обл., Україна). Для порівняльного аналізу використали також послідовності МГС 5S рДНК видів роду *Gentiana* з інших секцій, визначені нами раніше [15–17], а також взяті з бази даних GenBank (табл.).

ДНК виділяли з сухої листкової тканини за методикою з використанням ЦТАБ-буферу [18]. Ділянку 5S рДНК, яка містила МГС, ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням пари праймерів p5S1 (5'– ATG CAA GCT TGA CCT CCT GGG AAG TCC –3') і p5S2 (5'– GCA TAA GCT TGC GGA GTT CTG ATG GG –3'), специфічних до кодувальної ділянки.

Ампліфікацію проводили в термоциклері Techne Prime (Cole-Parmer, United States). Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ dNTP, 1,25 U Taq-полімерази, 0,25 мкМ праймера, 1×ПЛР-буфер з 1,5 мМ MgCl₂. Ампліфікацію проводили в наступному режимі: 1 цикл 95°C – 3 хв; 3 цикли (95°C – 30 с, 54°C – 30 с, 72°C – 30 с); 25 циклів (94°C – 20 с, 55°C – 20 с, 72°C – 25 с); 1 цикл 72°C – 5 хв.

Отримані ПЛР-продукти розділяли за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, вирізали та очищали від агарози з використанням набору реагентів Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («MBI Fermentas», Литва). Виділені фрагменти ДНК після гідролізу HindIII ендонуклеазою рестрикції лігували в плазмиду pUC18. Отримані плазмідні конструкції клонували в *E. coli*. Визначення послідовності клонуваних фрагментів ДНК проводили із використанням зворотного M13-праймера у GATC-Biotech (Нідерланди).

Вирівнювання отриманих послідовностей проводили з використанням алгоритму MUSCLE з подальшим уточненням вручну й аналізом у програмі Unipro UGENE [19]. Філогенетичну дендрограму будували за допомогою онлайн додатку W-IQ-TREE [20] методом максимальної правдоподібності з використанням GTR моделі заміщення і 1000 реплікацій для оцінки бутстреп-підтримки.

Результати та обговорення

Шляхом клонування у плазмідному векторі ампліфікованих методом ПЛР фрагментів ДНК, які містили МГС 5S рДНК, фланкований

ділянками кодувальної частини гена, було виділено по кілька клонів для кожного з досліджених видів тирличів, частина з яких була використана для секвенування. Результати порівняльного аналізу отриманих послідовностей представлено у таблиці. Довжина МГС варіювала у межах 333–500 п. н. Найменший розмір МГС характерний для *G. laciniata* (333 п. н.), а найбільший – для *G. acaulis* (500 п. н.). У інших видів з різних секцій довжина МГС була біля 400 п. н. Внаслідок одонуклеотидних інсерцій / делецій розмір клонованих МГС одного виду відрізнявся на 1–2 нуклеотиди (*G. cruciata* і *G. dahurica*). *G. laciniata* вирізнявся з-поміж інших видів також найменшим відсотком GC-пар – 37 %. Найбільшим цей показник був у *G. verna* subsp. *pontica* – 47 %. У решти видів цей показник коливався у межах 40–44 %.

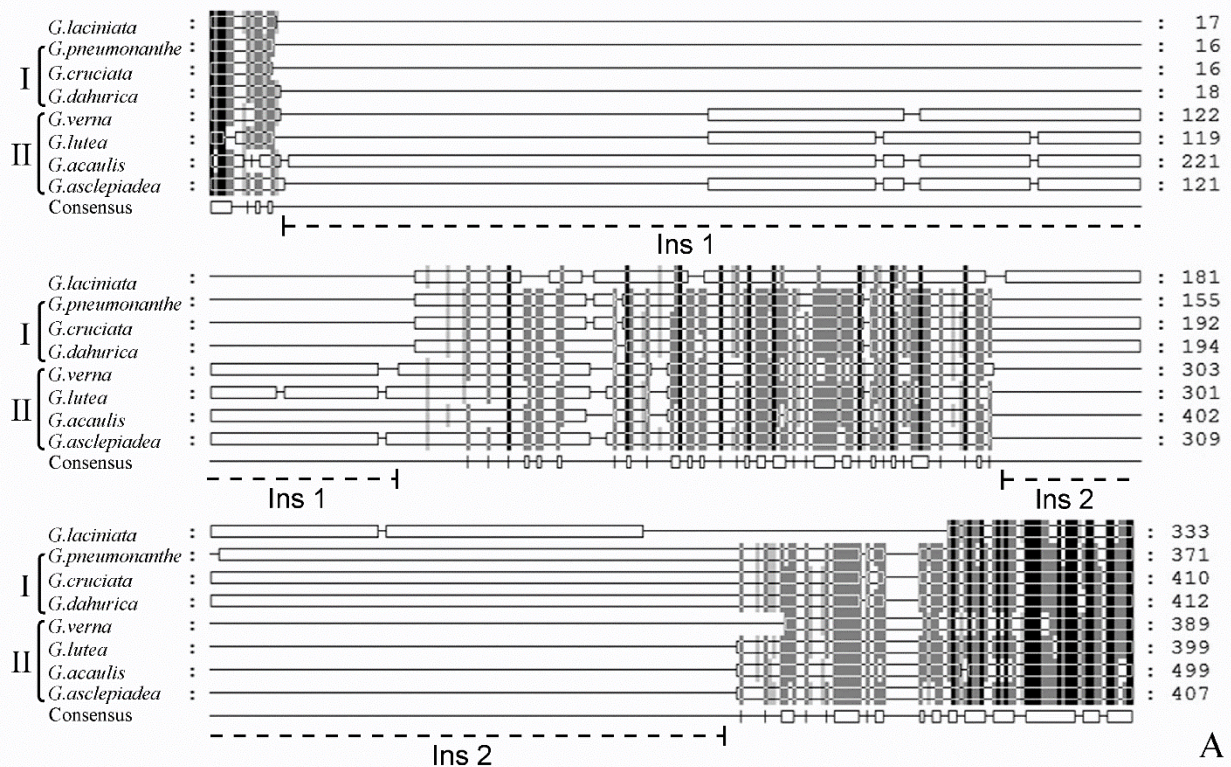
Вирівнювання і порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей МГС 5S рДНК видів різних секцій роду *Gentiana* показали, що ділянки з найбільшою гомологією розташовані на початку, в середині та в кінці спейсера

(рис. 1, А). Це зумовлено тим, що в цих ділянках знаходяться функціональні елементи, необхідні для регуляції транскрипції. Так на 5'-кінці МГС досліджених представників роду *Gentiana*, як і в інших видів рослин, міститься оліго-dT послідовність довжиною 5–9 нуклеотидів, яка виконує функцію ділянки термінації транскрипції (рис. 1, Б). На 3'-кінці МГС, що передує кодувальному регіону гена 5S рРНК, у положенні -29 – -27 п. н. розташована АТ-багата ділянка (ТАТА-бокс). Показано, що у *Arabidopsis thaliana* ця ділянка є місцем ініціації транскрипції [21]. Водночас, на відміну від *A. thaliana* й інших видів деяких родин покритонасінних рослин у більшості представників роду *Gentiana*, за виключенням *G. lacianata* і *G. dahurica*, в позиції -13 п. н. замість консервативного GC-елемента знаходиться динуклеотид АС, оточений АТ-багатою послідовністю, розташованою за ТАТА-боксом. У позиції -1 у всіх видів *Gentiana* знаходиться ще один консервативний нуклеотид С, описаний раніше для *A. thaliana* [21].

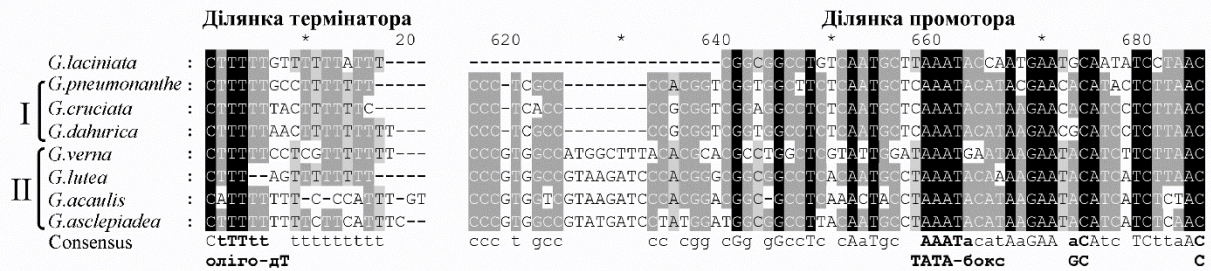
Таблиця. Досліджені види роду *Gentiana*, характеристики їхніх послідовностей МГС 5S рДНК і хромосомні числа

Секція	Вид	Клон	GenBank ACC No	Довжина МГС, п. н.	GC, %	Хромосомне число (2n)
<i>Chondrophyllae</i>	<i>G. laciniata</i>	Glac5S_1	PP514368	333	37	26* [5]
<i>Cruciata</i>	<i>G. cruciata</i>	Gcru5S_1	PP514362	410	41	52 [3, 4]
		Gcru5S_2	PP514363	409	41	
		Gcru5S_3	PP514364	408	42	
		Gcru5S_4	PP514365	408	42	
	<i>G. dahurica</i>	Gda_da5S_1	PP514366	413	44	26 [3, 4]
		Gda_da5S_2	PP514367	412	43	
<i>Pneumonanthe</i>	<i>G. pneumonanthe</i>		OR863281	371	42	26 [4]
<i>Calathianae</i>	<i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i>		EF626768	391**	47	28 [4]
<i>Ciminalis</i>	<i>G. acaulis</i>		OR863272	500	40	36 [4]
<i>Gentiana</i>	<i>G. lutea</i>		OR863273	399	41	40 [4]
***	<i>G. asclepiadea</i>		OR863274	408	41	36 [4]

Примітки: * – наведено число хромосом для *G. pyrenaica*, синонімом якого довгий час вважали вид *G. laciniata*; ** – вказано довжину послідовності повного МГС, оскільки у послідовності, представленої у Genbank, відсутні останні 20 п. н.; *** – приналежність *G. asclepiadea* до однієї з секцій роду має суперечливий характер і не визначена остаточно.



A



B

Рис. 1. Порівняльний аналіз структури МГС 5S рДНК видів роду *Gentiana*. А. Схематичне зображення вирівнювання повних послідовностей. Виділено ділянки, наявні у окремих груп видів (Ins 1 та Ins 2). I та II – перша і друга групи видів (відповідно), виокремлені залежно від наявності інсерцій. Б. Нуклеотидна послідовність консервативних ділянок в області термінатора і зовнішнього промотора. Позначено функціональні елементи. Фонове забарвлення використане для виділення консервативних нуклеотидів у послідовності: світло-сірим – нуклеотиди ідентичні у $\geq 60\%$, темно-сірим – у $\geq 80\%$, чорним – у 100% послідовностей.

Між описаними вище консервативними частинами МГС знаходяться варіабельні. Їхня міжвидова мінливість зумовлена наявністю двох протяжних інсерцій (Ins 1 і Ins 2) (рис. 1, А). Перша поліморфна ділянка довжиною понад 250 п. н. розташована після термінатора транскрипції. Наявність інсерції тут характерна для другої групи видів, до якої входять *G. verna*, *G. acaulis*, *G. lutea* і *G. asclepiadea*. Слід зазначити, що у *G. acaulis* у цій ділянці (44–203 п. н.) розташована дуплікація мотиву довжиною 80 п. н., завдяки чому МГС 5S рДНК цього виду є найдовшим з-поміж досліджених. Подібну дупліка-

цію іншого мотиву довжиною 52 п. н., розташованого на початку МГС, виявлено також і у *G. pneumonanthe* і видів секції *Cruciata*. Друга варіабельна ділянка довжиною понад 150 п. н. нуклеотидів розташована перед зовнішнім промотором. У ній розміщена інсерція Ins 2, яка характерна для першої групи видів, до складу якої входять *G. cruciata*, *G. dahurica* і *G. pneumonanthe*. Водночас, останній вид відрізняється від видів секції *Cruciata* розташованою в області (422–460 п. н.) делецією протяжністю 39 п. н. Серед досліджених видів вирізняється *G. laciniata*, МГС 5S рДНК якого істотно відрізня-

ється за організацією від решти видів. Зокрема у нього, як і у видів першої групи, відсутня ділянка Ins 1, а ділянка Ins 2 відмінна від інших видів за послідовністю і має меншу довжину (рис. 1, А).

На філогенетичній дендрограмі, побудованій за алгоритмом максимальної правдоподібності на основі вирівнювання послідовностей МГС гена 5S рРНК, види згрупувалися у два кластери (рис. 2). До першого кластера увійшли види секції *Cruciata* – *G. cruciata* і *G. dahurica* (рівень ідентичності послідовностей МГС яких між собою становить 91–96 %), а також *G. pneumonanthe* (секція *Pneumonanthe*) і *G. laciniata* (секція *Chondrophyllae*). Причому найбільш віддалений від представників інших секцій *G. laciniata* також попав до цього кластера. Рівень ідентичності МГС цього виду і видів з першої групи становив 38–40 %, а з другої групи – 10–14 %. Рівень ідентичності МГС *G. pneumonanthe* і видів секції *Cruciata* дорівнював 77 %, а з МГС видів інших секцій з другої групи – 19–26 %. Другий кластер сформували види з другої групи: *G. acaulis* (секція *Ciminalis*), *G. lutea* (секція *Gentiana*), *G. verna* (секція *Calathianae*) і *G. asclepiadea*. Приналежність останнього до однієї з секцій роду має суперечливий характер і не визначена остаточно. Рівень ідентичності МГС видів другої групи коливався в межах від % для *G. acaulis* і *G. verna* до 79 % для *G. lutea* та *G. asclepiadea*.

Узагальнюючи дані кластеризації видів роду *Gentiana* на основі нуклеотидної послідовності МГС 5S рДНК (рис. 2), слід зазначити, що таксони групуються відповідно до їхнього походження з двох центрів видоутворення (Європа

і Азія) [1]. Так, наприклад, до першого кластера увійшли види, які хоча й зростають у Європі (*G. cruciata*, *G. pneumonanthe*, *G. laciniata*), але відносяться до секцій, представники яких поширені переважно в Азії. Другий кластер сформували види, що входять до «європейських» секцій роду, представники яких зустрічаються переважно в Європі. До цього кластера також відноситься *G. asclepiadea*, який у минулому відносили до секції *Pneumonanthe*, але наразі його таксономічне положення залишається невизначеним остаточно. Слід відзначити, що для видів, які увійшли до першого кластера і відносяться до «азійських» секцій роду *Gentiana* (*Cruciata*, *Chondrophyllae*, *Pneumonanthe*), характерним є хромосомне число $2n = 2x = 26$, або, як у випадку *G. cruciata*, його тетраплоїдний варіант $2n = 4x = 52$. Для видів з другого кластера, т. зв. «європейських» секцій, хромосомні числа становили $2n = 28–40$ (табл.).

Отримані дані свідчать про те, що еволюція послідовності МГС гена 5S рРНК досліджених азійських і європейських видів роду *Gentiana* з двох різних центрів походження цих рослин відбувалася незалежно в різних напрямках впродовж тривалого періоду, наслідком чого стала їхня значна дивергенція за цією ознакою. Крім того, у досліджених видів відмічається тенденція до збільшення довжини міжгенного спейсера: лише в одного виду (*G. laciniata*) вона становить 333 п. н., у решти – близько 400 п. н., а в *G. acaulis* взагалі 500 п. н. Одним з механізмів збільшення довжини МГС є дуплікація протяжних (50–80 п. н) ділянок, розташованих на початку МГС.

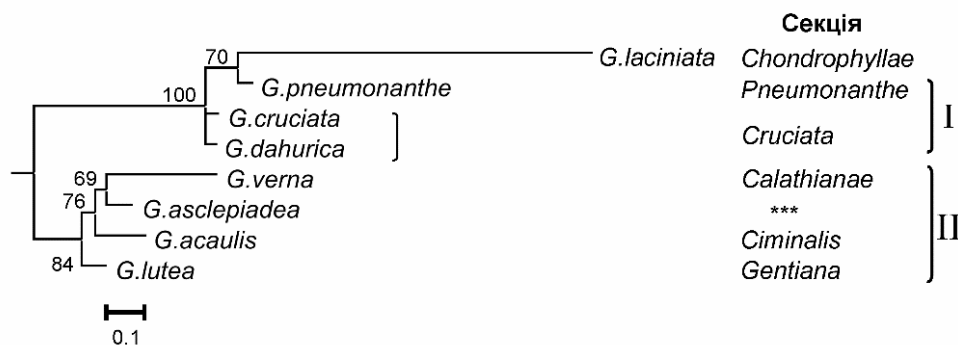


Рис. 2. Філогенетична дендрограма видів роду *Gentiana*, побудована на основі нуклеотидної послідовності МГС 5S рДНК за алгоритмом максимальної правдоподібності (*maximum likelihood*). Цифри біля вузлів показують значення бутстреп-підтримки, розраховані у відсотках для 1000 реплікацій. *** – приналежність *G. asclepiadea* до однієї з секцій роду має суперечливий характер і не визначена остаточно.

Висновки

Аналіз нуклеотидної послідовності міжгенного спейсера генів 5S рРНК трьох видів тирличів, а саме *G. dahurica* і *G. cruciata* з секції *Cruciata*, а також *G. laciniata* із секції *Chondrophyllae* показав, що в цілому досліджені клони окремих видів характеризуються високим рівнем ідентичності (92–96 %), а також мають типову для інших видів роду організацію цієї ділянки, до складу якої входять консервативні регуляторні елементи транскрипції. На основі порівняння організації нуклеотидних послідовностей МГС цих і досліджених раніше видів з різних секцій роду *Gentiana*, а також результатів кластеризації можна виділити дві групи видів, які суттєво відрізняються за організацією МГС. Одна з них включає *G. asclepiadea* та види секцій *Gentiana*, *Ciminalis* і *Calathianae*, а друга – види секцій *Cruciata* і *Pneumonanthe*. *G. lacini-*

ata з секції *Chondrophyllae* відрізняється за послідовністю МГС від видів з обох груп. Результати групування таксонів загалом узгоджуються із загальними уявленнями про систематику роду і свідчать про те, що ділянка МГС 5S рДНК може бути зручним маркером для дослідження питань еволюції і систематики видів роду *Gentiana*.

Роботу проведено за часткової фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021 рр.) у рамках проекту: «Генетичний контроль і біохімічні властивості організмів за патологічних і стресових станів та їх важливість для розробки діагностики і терапії» (№ 0117U000205), за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (НДР № 0118U000137), Фонду Simons Foundation, США (Award #1290589, І. О. Андреев), а також у рамках виконання НДР «Генетичні і фізіолого-біохімічні механізми адаптації рослин до екстремальних умов довкілля» (№ 0120U105249).

References

1. Ho T. N., Liu S. W. The infrageneric classification of *Gentiana* (Gentianaceae). *Bull. Br. Museum. Nat. Hist. Bot.* 1990. Vol. 20 (2). P. 169–192.
2. Strashniuk N. M., Hrytsak L. R., Les'kova O. M., Mel'nyk V. M. *Gentiana* L. species of Ukrainian flora in nature and in culture in vitro. *Ukr. Bot. J.* 2005. Vol. 62 (3). P. 337–48.
3. Yuan Y. M. Karyological studies on *Gentiana* section *Cruciata* Gaudin (Gentianaceae) from China. *Caryologia.* 1993. Vol. 46 (2–3). P. 99–114. doi: 10.1080/00087114.1993.10797252.
4. Mel'nyk V. M., Drobyk N. M., Twardovska M. O., Kunakh V. A. Karyology of European species of genus *Gentiana* L. In: *The Gentianaceae – Volume 1: Characterization and Ecology.* Springer, Berlin, Heidelberg; 2014. P. 219–230. doi: 10.1007/978-3-642-54010-3_7.
5. Kupfer P., Yuan Y. M. Karyological studies on *Gentiana* sect. *Chondrophyllae* (Gentianaceae) from China. *Plant Syst. Evol.* 1996. Vol. 200 (3–4). P. 161–176. doi: 10.1007/BF00984933.
6. Tutin T. G. *Gentiana* L. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., et al., editors. *Flora Europaea*, Vol. 3. Cambridge: University Press, 1972. P. 59–63. doi: 10.5281/zenodo.305475.
7. *Gentiana laciniata* Kit. ex Kanitz. The World Flora Online. Available from: <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000697809>.
8. Favre A., Pringle J. S., Heckenhauer J., Kozuharova E., Gao Q., Lemmon E. M., et al. Phylogenetic relationships and sectional delineation within *Gentiana* (Gentianaceae). *Taxon.* 2020. Vol. 69 (6). P. 1221–1238. doi: 10.1002/TAX.12405.
9. Favre A., Paule J., Ebersbach J. Incongruences between nuclear and plastid phylogenies challenge the identification of correlates of diversification in *Gentiana* in the European Alpine System. *Alp. Bot.* 2022. Vol. 132 (1). P. 29–50. doi: 10.1007/S00035-021-00267-6/TABLES/4.
10. Gielly L., Yuan Y. M., Kupfer P., Taberlet P. Phylogenetic use of noncoding regions in the genus *Gentiana* L.: Chloroplast trnL (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1996. Vol. 5 (3). P. 460–466. doi: 10.1006/mpev.1996.0042.
11. Yuan Y. M., Kupfer P., Doyle J. J. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Am. J. Bot.* 1996. Vol. 83 (5). P. 641–652. doi: 10.1002/j.1537-2197.1996.tb12750.x.
12. Yuan Y. M., Kupfer P. The monophyly and rapid evolution of *Gentiana* sect. *Chondrophyllae* Bunge s.l. (Gentianaceae): evidence from the nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Bot. J. Linn. Soc.* 1997. Vol. 123 (1). P. 25–43. doi: 10.1111/j.1095-8339.1997.tb01403.x.
13. Hämmerli M. *Molecular Aspects in Systematics of Gentiana Sect. Calathianae* Froel. PhD Thesis. Universite de Neuchatel; 2007.
14. Wong K. L., But P. P. H., Shaw P. C. Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal *Gentiana* species and their adulterants. *Chinese Med. (United Kingdom).* 2013. Vol. 8 (1). P. 1–12. doi: 10.1186/1749-8546-8-16.
15. Andreev I. O., Melnyk V. M., Myryuta G. Y., Kunakh V. A. Polymorphism of 5S rDNA intergenic spacer in some *Gentiana* species. *Factors Exp. Evol. Org.* 2017. Vol. 20. P. 42–46. doi: 10.7124/FEEO.v20.731.
16. Andreev I., Melnyk V., Myryuta G., Shelifist A., Volkov R., Kunakh V. Molecular organization of the intergenic spacer of 5S rDNA in some species of the genus *Gentiana* L. In: Volkov R., editor. *5S ribosomal DNA of flowering plants.* Chernivtsi: Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, 2021. P. 105–122.

17. Mel'nyk V. M., Andreev I. O., Myryuta G. Y., Shelyfist A. Y., Volkov R. A., Kunakh V. A. Molecular organization of 5S rDNA intergenic spacer in *Gentiana pneumonanthe* L. and *G. punctata* L. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breeders Ukr.* 2020. Vol. 18 (1–2). P. 9–15. doi: 10.7124/visnyk.utgis.18.1-2.1349.
18. 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 (2). P. 69–76. doi: 10.1007/BF00020088.
19. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Varlamov A., Vaskin Y., Efremov I., et al. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012. Vol. 28 (8). P. 1166–1167. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTS091.
20. Trifinopoulos J., Nguyen L. T., von Haeseler A., Minh B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44 (W 1). P. W 232–235. doi: 10.1093/nar/gkw256.
21. Douet J., Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity (Edinb).* 2007. Vol. 99 (1). P. 5–13. doi: 10.1038/sj.hdy.6800964.

MEL'NYK V. M.¹, ANDREEV I. O.¹, VOLKOV R. A.², KUNAKH V. A.¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150

² Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,
Ukraine 58012, Chernivtsi, Kotsiubynski str., 2

5S rDNA INTERGENIC SPACER OF SOME SPECIES OF *CRUCIATA* AND *CHONDROPHYLLAE* SECTIONS AND ITS APPLICATION IN TAXONOMY OF GENUS *GENTIANA*

Aim. The 5S rDNA intergenic spacer (IGS) region is a convenient tool for studying genome evolution and systematics of higher plants. The aim was to investigate the nucleotide sequence of 5S rDNA in some species of the sections *Cruciata* and *Chondrophyllae*, as well as to study the peculiarities of this region organisation by comparative analysis with other *Gentiana* species. **Methods.** Polymerase chain reaction, cloning, sequencing, bioinformatic analysis. **Results.** The cloned IGS regions of *G. laciniata*, *G. cruciata* and *G. dahurica* were sequenced and analysed. Typical regulatory elements were found in the regions of terminator and external promoter of 5S rRNA gene. Based on the comparative analysis, two groups of species were distinguished that differ significantly in the organisation of this region. One includes *G. asclepiadea* and species of the sections *Gentiana*, *Ciminalis* and *Calathianae*, and the other includes species of the sections *Cruciata* and *Pneumonanthe*. *G. laciniata* (sect. *Chondrophyllae*) differs in the IGS organization from species of both groups. **Conclusions.** The results of taxon grouping are generally consistent with the genus systematics and indicate that 5S rDNA IGS region can be a convenient tool for studying evolution and systematics of the genus. **Keywords:** *Gentiana* species, 5S rDNA intergenic spacer, molecular organization, phylogeny.