

УДК 577.113.5: 582.926.2

ОРГАНІЗАЦІЯ ТА МІНЛИВІСТЬ МІЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА 5S рДНК *LATHYRUS VENETUS*

Ю.О. ТИНКЕВИЧ¹, А.О. НЕВЕЛЬСЬКА¹, І.І. ЧОРНЕЙ², Р.А. ВОЛКОВ¹

¹Кафедра молекулярної генетики та біотехнології

²Кафедра ботаніки, лісового і садово-паркового господарства
 Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
 Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
 e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Мета. У популяціях *Lathyrus venetus* (Mill.) Wohlf. – реліктового виду, включеного до Червоної книги України з статусом «вразливий» – більшість рослин є гібридними формами зі спорідненим видом *L. vernus* (L.) Bernh. Тому використання молекулярних маркерів, таких як послідовність міжгенного спейсера (МГС) 5S рДНК є необхідним для оцінки генетичної однорідності популяцій *L. venetus* та розробки раціональної стратегії збереження цього виду. **Методи.** ПЛР-ампліфікація, клонування та розшифрування нуклеотидної послідовності МГС 5S рДНК *L. venetus*. **Результати.** Встановлено, що у геномі *L. venetus* присутні два варіанта повторів 5S рДНК, розмір МГС у яких становить 158 та 162 п.н., а вміст GC-пар – 22,8-22,9 %. У фрагменті МГС, який передує ділянці, що кодує 5S рРНК знайдено характерні для покритонасінних елементи зовнішнього промотора РНК полімерази III. Серед представників 17 родів бобових найвищий рівень подібності послідовностей МГС – 85,4-86,7 % – було виявлено між *L. venetus* і *Pisum sativum*, які належать до триби *Fabeae*. **Висновки.** Висока мінливість МГС 5S рДНК робить їх зручним молекулярним маркером для прояснення філогенетичних відносин між родами та видами в межах триби *Fabeae*.

Ключові слова: *Lathyrus*, 5S рДНК, молекулярні маркери, зникаючі види.

Вступ. Рід Чина (*Lathyrus* L.) належить до еволюційно просунутої і високоспеціалізованої триби *Fabeae* (бобові) родини *Fabaceae* та охоплює близько 160 видів [1]. Представники роду розповсюджені у різноманітних біотопах, переважно, помірної зони північної півкулі. В Україні росте 31 вид цього роду, які належать до 3 підродів та 16 секцій, причому, два з них – чину посівну (*L. sativus* L.) та чину запашну (*L. odoratus* L.) вирощують у культурі [2]. Три види роду *Lathyrus* занесені до Червоної книги України: чина гладенька (*L. laevigatus* (Waldst. et Kit.) Gren.), чина трансильванська (*L. transsilvanicus* (Spreng.) Rchb.) та чина ряба або чина венеціанська (*L. venetus*). Це переважно лісові види, популяції яких знаходяться під загрозою знищення у зв'язку з інтенсивною експлуатацією лісових масивів останніми десятиліттями. Особливо небезпечна ситуація склалася із чиною венеціанською: популяції цього виду критично малочисельні, багато з них за останній час зникли. За останніми даними, поширення цього виду ще більш обмежене, ніж вважалось раніше, а більшість відомих популяцій в дійсності представлені гібридними формами між *L. venetus* та близько спорідненим широко розповсюдженим видом *L. vernus* [3].

Для розробки ефективних заходів щодо збереження популяцій чини венеціанської та відновлення їх чисельності важливо мати достовірну інформацію стосовно їхнього сучасного стану. Зокрема, необхідно достовірно розрізняти *L. venetus* та морфологічно подібні гібридні форми із спорідненими видами. Ефективним методом для вирішення цього завдання є застосування молекулярних маркерів, одним із яких може бути нуклеотидна послідовність міжгенного спейсера (МГС) 5S рДНК.

Ділянки 5S рДНК належать до класу тандемно організованих повторюваних послідовностей, які утворюють кластери, локалізовані на одній чи декількох хромосомах. Кількість по-

© Ю.О. ТИНКЕВИЧ, А.О. НЕВЕЛЬСЬКА, І.І. ЧОРНЕЙ, Р.А. ВОЛКОВ, 2015

вторів 5S рДНК у вищих рослин складає від декількох сотень до десятків тисяч на геном [4]. До складу кожної повторюваної одиниці входять еволюційно консервативна ділянка, що кодує 5S рРНК та варіабельний МГС. Нейтральний характер мутацій, які виникають у МГС дозволяє їм уникати дії добору, що призводить до їх накопичення. Завдяки високому темпу еволюції різниця у послідовності МГС спостерігається навіть між близькоспорідненими видами, а інколи – і між особинами у популяціях [5, 6].

Однією із особливостей еволюції повторів 5S рДНК (як і більшості повторюваних послідовностей) є явище концертної (узгодженої) еволюції [5, 7]. Це явище полягає у здатності до гомогенізації всіх послідовностей в межах кластера, а інколи – і між кластерами. Для 5S рДНК гомогенізація, особливо між послідовностями з різних кластерів, не завжди відбувається швидко та ефективно, внаслідок чого можливе одночасне існування в геномі двох та більше варіантів 5S рДНК, що відрізняються за нуклеотидною послідовністю [8].

На сьогодні організація МГС 5S рДНК у представників роду *Lathyrus* та більшості споріднених груп залишається не вивченою. Але, для того, щоб оцінити можливість використання послідовності МГС як молекулярного маркера у таксономічних дослідженнях, важливо визначити такі параметри, як розміри, еволюційна мінливість та внутрішньогеномний поліморфізм цієї ділянки геному. Тому метою даної роботи було клонування, розшифровка та аналіз нуклеотидної послідовності МГС повторів 5S рДНК *L. venetus* та її порівняння з гомологічною ділянкою інших представників родини Fabaceae.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження був зразок *L. venetus* з колекції Гербарію Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича (CHER). Загальну ДНК екстрагували з гербаризованого листа згідно стандартного протоколу з використанням як детергенту цетавлону [9].

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для цього використовували пару універсальних праймерів 5S-14a-Ph (5'-GCGAGAGTAGTACTAGG ATGCGTGAC-3') і 5S-15 (5'-GCTTAACCTTCGGAGTTCTGA

TGGGA-3'), які комплементарні до ділянки, що кодує 5S рРНК у дводольних рослин. Праймер 5S-14a-Ph містив на 5'-кінці фосфатну групу, що дозволяє збільшити ефективність лігування при клонуванні ПЛР-продуктів за тупим кінцем. Застосовані праймери забезпечують ампліфікацію повного МГС та фланкуючих ділянок кодуючої послідовності. Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила такі компоненти: 10–30 нг загальної геномної ДНК, 1,0 од. акт. ДНК-полімерази (Maxima DNA polymerase, Thermo scientific), 0,1 мМ суміші дезоксирибонуклеотидфосфатів, 1х буфер для ПЛР та 0,5 мкМ кожного з двох праймерів.

ПЛР проводилась з використанням ампліфікатору MiniCycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95 °С, 15 хв; (2) денатурація ДНК – 94 °С, 45 с; (3) гібридизація праймерів – 57 °С, 45 с; (4) синтез ДНК – 72 °С, 1 хв; (5) закінчення ампліфікації – 72 °С, 10 хв; (6) припинення реакції – 4 °С. Загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу у 2 % агарозному гелі.

Для клонування ПЛР-продукти обробляли рестриктазою BamHI, сайт впізнавання якої присутній у ділянці, що кодує 5S рРНК у вищих рослин. Після цього продукти рестрикції лігували з використанням T4 ДНК-лігази (Thermo scientific) по утвореному липкому кінцю та фосфорильованому тупому кінцю у плазмідний вектор pBlueSkript II KS (+), попередньо розщеплений рестриктазами BamHI та EcoRV. Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL-blue проводили методом електропорації з використанням приладу *E. coli* Pulser (BioRad, США). Клони, що містили рекомбінантні плазміди, виявляли методом blue-white colony selection та перевіряли рестриктазним картуванням. Плазміди виділяли методом лужного лізису [10]. Ферментативні реакції проводили згідно з рекомендаціями фірми-постачальника.

Рекомбінантні плазміди, що містили інсerti 5S рДНК сиквенували на фірмі GATC (Німеччина). Первинну обробку отриманої нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR [11]. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Clustal V [12]. По-

шук послідовностей у базі даних Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST [13].

Результати та обговорення

У наших експериментах із клонування для однієї рослини *L. venetus* було відібрано 12 колоній трансформантів, з яких виділено зразки плазмідної ДНК. Для перевірки наявності інсерту 5S рДНК ці плазмідні були оброблені парою рестриктаз HindIII та BamHI, сайти впізнавання яких знаходяться з двох сторін від нього. Це призводило до появи на електрофореграмі двох фрагментів ДНК. Фрагмент більшого розміру для всіх зразків мав довжину приблизно 2900 п.н., що відповідає розміру лінійної ДНК вектора рBlueScript II KS. Фрагмент меншого розміру мав довжину приблизно 250 п.н., що відповідає розміру ПЛР-продукту 5S рДНК *L. venetus*. Загалом, було ідентифіковано чотири зразки плазмідної ДНК зі вставкою, з яких два – LaVen1 та LaVen2 – відібрано для сиквенування.

Комп'ютерна обробка отриманих в результаті сиквенування послідовностей показала, що обидва клони містять МГС 5S рДНК, фланкований з обох сторін фрагментами кодуючої послідовності. Загальна довжина інсертів, від праймера 5S-14a до сайту BamHI, становила 253 п.н. для клону LaVen1 та 249 п.н. для LaVen2. Визначення границь кодуючої ділянки дозволило встановити розміри МГС, що складають для послідовностей LaVen1 та LaVen2, відповідно, 162 та 158 п.н. (табл. 1). У двох проаналізованих нами послідовностях 5S рДНК *L. venetus* не знайдено мутацій у присутніх фрагментах кодуючої ділянки, за винятком одної трансверсії C→G у клоні LaVen2.

Таблиця 1. Характеристика сиквенування повторюваних ділянок 5S рДНК *L. venetus*

Назва клону	Довжина інсерту, п.н.	Довжина МГС, п.н.	Характеристика МГС	Вміст GC-пар, %	
				кодуюча ділянка	МГС
LaVen1	253	162	Повнорозмірний	53,9	22,9
LaVen2	249	158	Повнорозмірний	53,9	22,8

Розрахунок нуклеотидного складу МГС показав, що для нього властивий низький вміст GC-пар – 23 %. На противагу цьому, у розшифрованих нами фрагментах кодуючої ділянки вміст GC-пар становить 53,9 % (табл. 1). Вирівнювання отриманих нуклеотидних послідовностей показало, що рівень

подібності між МГС 5S рДНК з клонів LaVen1 та LaVen2 становить 88 % (табл. 2). При цьому в його межах було виявлено одну чотирирунуклеотидну делецію, 10 транзицій та 9 трансверсій (рис. 1). Отже, в межах геному у *L. venetus* присутні як мінімум два варіанта повторів 5S рДНК, які мають майже однакову довжину, але відрізняються за послідовністю МГС.

Таблиця 2. Рівень подібності (%) МГС 5S рДНК представників родини Fabaceae

	1	2	3	4	5	6	7
1	100	88,0	86,7	53,1	50,3	35,2	41,2
2	–	100	85,4	53,2	50,3	35,4	42,3
3	–	–	100	48,1	47,6	36,1	39,1
4	–	–	–	100	51,8	42,6	48,6
5	–	–	–	–	100	34,0	43,5
6	–	–	–	–	–	100	46,9
7	–	–	–	–	–	–	100

Примітки. 1 – клон LaVen1; 2 – клон LaVen2; 3 – *Pisum sativum*; 4 – *Trifolium subterraneum*; 5 – *Medicago arborea*; 6 – *Vigna unguiculata*; 7 – *Glycine max*.

Аналіз отриманих послідовностей показав, що в МГС клонів LaVen1 та LaVen2 присутні мотиви, які відповідають зовнішнім регуляторним елементам промотора 5S рДНК [14]. До таких елементів належать шестинуклеотидний мотив TATATA, розміщений на 3' кінці МГС у позиції –28 п.н. від 5' кінця кодуючої ділянки, а також мотиви GC та C в позиціях –12 п.н. та –1 п.н., відповідно. Також безпосередньо після 3' кінця кодуючої ділянки локалізована оліго-Т послідовність, що виконує функцію термінатора транскрипції РНК-полімерази III [14]. У клоні LaVen2 у позиції, що відповідає регуляторному мотиву GC присутня транзиція C→T. Крім того, у МГС присутні декілька коротких (4–8 п.н.) прямих повторів, які, імовірно, виникли як результат тандемних дуплікацій.

Для порівняння структурної організації МГС *L. venetus* з іншими представниками Fabaceae проведено пошук у базі даних GenBank, який виявив послідовності 5S рДНК для представників 17 родів цієї родини. Проте лише для п'яти родів, які як і *Lathyrus* належать до підродини Faboideae, рівень гомології МГС був достатній для коректного вирівнювання (табл. 2, рис. 2). При цьому в межах МГС ділянки підвищеної гомології локалізуються переважно на його 5' та 3' кінцях. Послідовності МГС

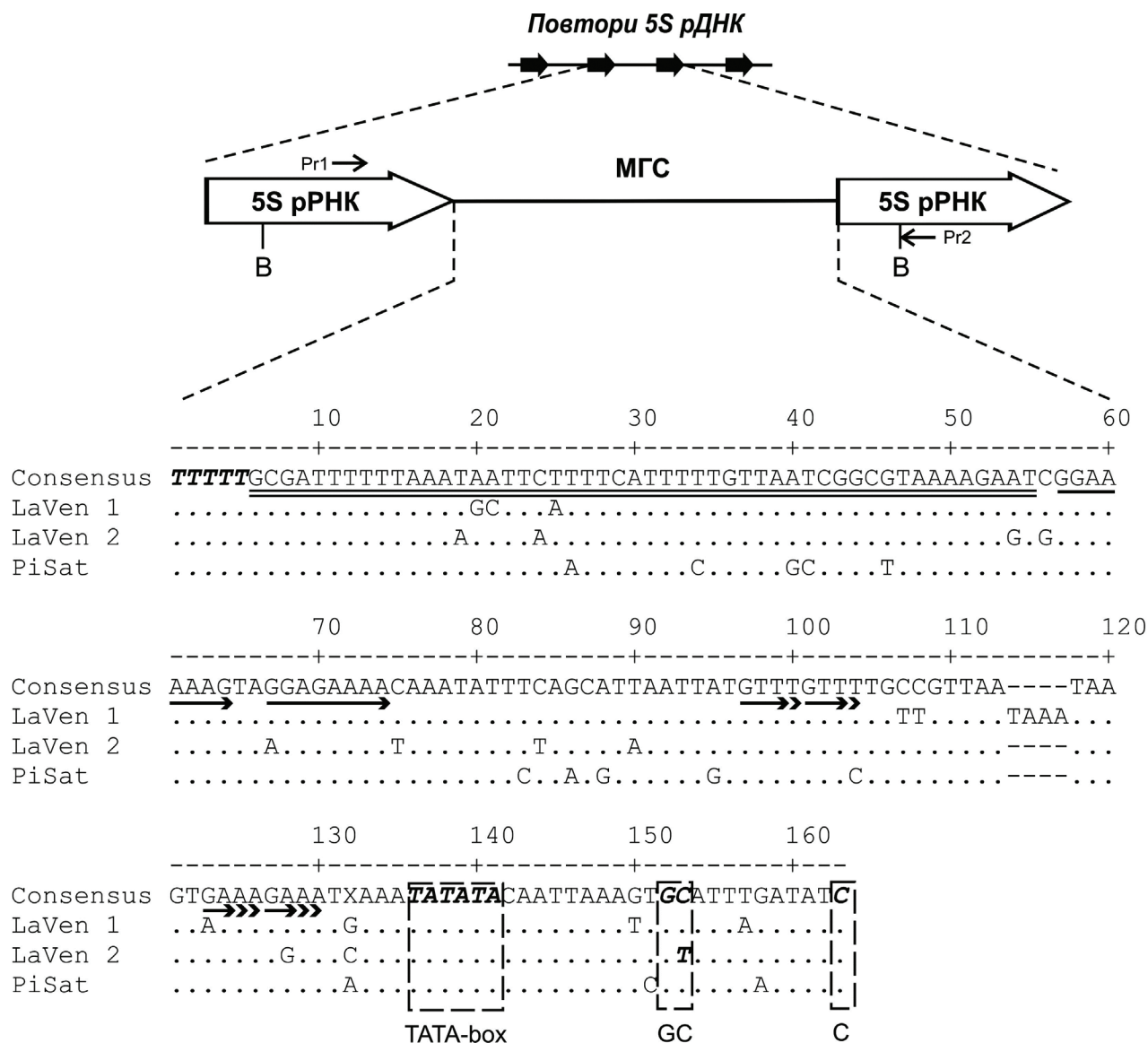


Рис. 1. Структурна організація МГС 5S рДНК *L. venetus* (LaVen) та *Pisum sativum* (PiSat). Pr1 та Pr2 – праймери 5S-14а-Ph та 5S-15, відповідно, B – локалізація сайту впізнавання рестриктази BamHI. Жирним курсивом виділено оліго-Т послідовність термінатора та елементи зовнішнього промотора. Стрілками позначено розташування повторюваних мотивів у МГС, подвійним підкресленням відмічено ділянку довжиною 50 п.н., що дуплікується у довгому варіанті повторів 5S рДНК *P. sativum*

представників інших 12 родів бобових більш суттєво відрізнялись від МГС *L. venetus* за довжиною за рахунок делецій/інсерцій та/або мали рівень подібності менше 30–35 %.

Зіставлення між собою послідовностей МГС *L. venetus* та інших представників підродини Faboideae показало (табл. 2), що найвищий рівень подібності з клонами LaVen1 та LaVen2 – 86,7 і 85,4 % – має короткий варіант МГС *Pisum sativum* L.

(довгий варіант МГС *P. sativum* відрізняється від короткого присутністю тандемної дуплікації довжиною 50 нп на початку спейсерної ділянки – див. рис. 1). У той же час гомологія між послідовностями МГС *Lathyrus* та *Pisum*, з одного боку, та інших представників підродини Faboideae, з другого, не перевищує 53,2 %. Єдиними ділянками МГС, які мають подібність у видів з різних триб підродини Faboidea, є 5' та 3' кінцеві ділянки, у яких розміщені необхідні для транскрипції послідовності зов-

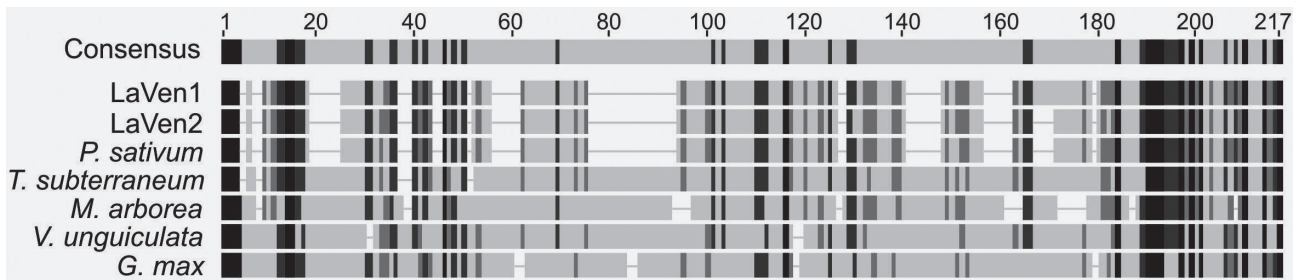


Рис. 2. Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей МГС 5S рДНК клонів *L. venetus* та деяких представників родини Fabaceae. *Pisum sativum* L. (GenBank Acc. No AY499178) [15]; *Trifolium subterraneum* L. (AM258986.1); *Medicago arborea* L. (KF435091) [16]; *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (AF141141); *Glycine max* (L.) Merr. (X15199) [17]. Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: – менше 50 %, – 60-80 %, – 80-100 %, – 100 %

нішнього промотора РНК-полімерази III. Враховуючи важливу функцію цих ділянок, можна вважати, що ці послідовності зберігаються завдяки постійній роботі стабілізуючого добору.

Як показав проведений аналіз, структурна організація послідовностей 5S рДНК *L. venetus* є аналогічною до цих генів із інших рослин [5, 15, 17–20]. Відносно низька гомологія між МГС двох досліджених нами клонів чини, що близька до подібності між клонами *L. venetus* та представником іншого роду – *P. sativum* вказує на недостатність процесів гомогенізації послідовностей 5S рДНК у геномі *L. venetus*. Раніше нами встановлено, що у геномах багатьох диплоїдних видів роду *Solanum* окремі повтори 5S рДНК майже ідентичні між собою [5], що добре узгоджується з уявленням про концертний характер еволюції цієї ділянки геному [7]. Досить високим – більше 98 % – виявився рівень внутрішньогеномної подібності МГС 5S рДНК у диплоїдного виду *Rosa rugosa*, проте у спорідненого диплоїда *R. nitida* рівень подібності МГС між різними клонами коливався від 92,2 до 99,5 % [21]. Тобто, гомогенізація повторів 5S рДНК може відбуватися із різною ефективністю навіть у близько споріднених видів. Що стосується *L. venetus*, то отримані результати вказують, що у цього виду гомогенізація як мінімум частини повторів 5S рДНК відбувається недостатньо ефективно.

Однією з причин, що зумовлюють прискорене накопичення мутацій, може бути перетворення функціональної послідовності у псевдоген [22]. Щодо клону LaVen2 на це опосередковано може вказувати наявність мутацій в GC-елементі зовнішнього промотора та у кодуючій ділянці. Крім того, у послідовності МГС клону LaVen2 спостері-

гали дещо більшу кількість мутацій відносно до МГС *P. sativum*, який можна розглядати як зовнішню групу для МГС 5S рДНК *L. venetus*. Ці характеристики LaVen2 вказують на більшу швидкість молекулярної еволюції цієї послідовності та імовірну втрату контролю стабілізуючого добору над шкідливими мутаціями внаслідок її перетворення у псевдоген [22].

Як свідчать наші данні, максимальний рівень подібності між двома сиквендованими нами МГС 5S рДНК *L. venetus* та МГС представників інших родів Fabaceae становить 86,7 і 85,4 % у випадку *P. sativum*. Відповідно, можна припустити, що між видами роду *Lathyrus* слід очікувати рівень подібності МГС більше, ніж ці значення. Для перевірки цього припущення необхідно провести сиквенування 5S рДНК декількох видів роду *Lathyrus*.

Оскільки рід *Pisum* L. належить до однієї із *Lathyrus* триби Fabaceae, значно вища подібність між послідовностями МГС 5S рДНК представників цих родів порівняно із іншими видами метеликових видається цілком очікуваною. Проведений аналіз також показує, що у представників одного чи кількох близько споріднених родів (в межах однієї триби) послідовність МГС 5S рДНК зберігає достатній для коректного порівняння рівень гомології. Аналогічну тенденцію ми встановили раніше для представників триб Rosae та Sanguisorbae родини Rosaceae [21].

Висновки

Досліджено організацію МГС 5S рДНК «червонокнижного» представника родини Fabaceae – *L. venetus*. Встановлено, що як мінімум частина повторів уникає повної гомогенізації під час концерт-

ної еволюції. Причиною пришвидшеного накопичення мутацій одним із досліджених варіантів 5S рДНК може бути його перетворення у псевдоген.

Високий рівень мінливості МГС вказує на можливість використовувати порівняння цієї ділянки для уточнення філогенетичних відносин між таксонами низького рангу (вид, рід, триба), зокрема – між представниками триби Fabaeae. У той же час МГС представників віддаленіших таксонів мають гомологію лише у ділянках, в яких розміщені зовнішні регуляторні елементи РНК-полімерази III.

Перелік літератури

1. *Asmussen C., Liston A.* Chloroplast DNA characters, phylogeny, and classification of *Lathyrus* species (Fabaceae) // *Am. J. Bot.* – 1998. – Vol. 85, № 3. – P. 387–401.
2. *Крицька Л.І.* Рід *Lathyrus* (Fabaceae) у флорі України // *Укр. ботан. журн.* – 2014. – Т. 71, № 6. – С. 676–689.
3. *Казало О.О., Чорней І.І.* Чина ряба, чина венеціанська (*Lathyrus venetus* (Mill.) Wohlf.) // *Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Я.П. Дідуха.* – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – С. 473.
4. *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.
5. *Volkov R.A., Zanke C., Panchuk I.I., Hemleben V.* Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding // *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – Vol. 103. – P. 1273–1282.
6. *Denk T., Grimm G.* The oaks of western Eurasia: Traditional classifications and evidence from two nuclear markers // *Taxon.* – 2010. – Vol. 59. – P. 351–366.
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. *Fulnecek J., Lim K.Y., Leitch A.R., Kovarik A., Matyasek R.* Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species // *Heredity.* – 2002. – Vol. 88. – P. 19–25.
9. *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.
10. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* Molecular cloning. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – 1626 p.
11. *DNASTAR, 1998.* MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
12. *Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R.* CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment // *Bioinformatics.* – 1992. – Vol. 8. – P. 189–191.
13. *Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.* Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucl. Acids Res.* – 1997. – Vol. 25. – P. 3389–3402.
14. *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.
15. *Ellis T.H., Lee D., Thomas C.M., Simpson P.R., Cleary W.G., Newman M.-A., Burcham K.W.* 5S rRNA genes in *Pisum*: sequence,

- long range and chromosomal organization // *Mol. Gen. Genet.* – 1988. – Vol. 214, № 2. – P. 333–342.
16. *Galian J.A., Rosato M., Rossello J.A.* Partial sequence homogenization in the 5S multigene families may generate sequence chimeras and spurious results in phylogenetic reconstructions // *Syst. Biol.* – 2014. – Vol. 63, № 2. – P. 219–230.
 17. *Gottlob-McHugh S.G., Levesque M., MacKenzie K., Olson M., Yarosh O., Johnson D.A.* Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants // *Genome.* – 1990. – Vol. 33, № 4. – P. 486–494.
 18. *Grimm G.W., Denk T.* The reticulate origin of modern plane trees (*Platanus*, Platanaceae): A nuclear marker puzzle // *Taxon.* – 2010. – Vol. 59, № 1. – P. 134–147.
 19. *Campbell B.R., Song Y., Posch T.E., Cullis C.A., Town C.D.* Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana* // *Gene.* – 1992. – Vol. 112. – P. 225–228.
 20. *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.
 21. *Tynkevich Y.O., Volkov R.A.* Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa* // *Cytol. Genet.* – 2014. – Vol. 48, № 1. – P. 1–6.
 22. *Takahata N., Kimura M.* A model of evolutionary base substitutions and its application with special reference to rapid change of pseudogenes // *Genetics.* – 1981. – Vol. 98. – P. 641–657.

Представлено В.М. Мельником
Надійшла 15.05.2015

ОРГАНИЗАЦИЯ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ МЕЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА 5S рДНК *LATHYRUS VENETUS*

Ю.О. Тинкевич¹, А.О. Невельская¹, И.И. Чорней², Р.А. Волков¹

¹ Кафедра молекулярной генетики и биотехнологии
² Кафедра ботаники, лесного и садово-паркового хозяйства
Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича
Украина, 58012, Черновцы, ул. Коцюбинского, 2
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Цель. В популяциях *Lathyrus venetus* (Mill.) Wohlf. – реликтового вида, включенного в Красную книгу Украины со статусом «уязвимый» – большинство растений представляют собой гибридные формы с родственным видом *L. vernus*. Поэтому использование молекулярных маркеров, таких как последовательность межгенного спейсера (МГС) 5S рДНК необходимо для оценки генетической однородности популяций *L. venetus* и разработки рациональной стратегии сохранения этого вида. **Методы.** ПЦР-амплификация, клонирование и расшифровка нуклеотидной последовательности МГС 5S рДНК *L. venetus*. **Результаты.** Установлено, что в геноме *L. venetus* присутствуют два варианта повторов 5S рДНК, размер МГС у которых составляет 158 и 162 нп, а содержание GC-пар – 22,8–22,9 %. Во фрагменте МГС, предшествующем участку, который кодирует 5S рРНК, найдены характерные для покрытосеменных элементы внеш-

него промотора РНК полимераза III. Среди представителей 17 родов бобовых самый высокий уровень сходства последовательностей МГС – 85,4-86,7 % – был обнаружен между *L. venetus* и *Pisum sativum*, которые относятся к трибе Fabaeae. **Выводы.** Высокая изменчивость МГС 5S рДНК делает их удобным молекулярным маркером для прояснения филогенетических связей между родами и видами в пределах трибы Fabaeae.

Ключевые слова: 5S рДНК, молекулярные маркеры, исчезающие виды, *Lathyrus*.

ORGANIZATION AND VARIABILITY OF THE 5S rDNA INTERGENIC SPACER OF *LATHYRUS VENETUS*

Y.O. Tynkevich¹, A.O. Nevelska¹, I.I. Chorney², R.A. Volkov¹

¹ Dept. of Molecular Genetics and Biotechnology

² Dept. of Botany, Forestry and Horticulture

Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi

Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynski str., 2

e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Aim. In populations of *Lathyrus venetus* (Mill.) Wohlf., which is an endangered species included in the Red Book of Ukraine,

the majority of plants are hybrids between the original species and the related *L. vernus*. Therefore, the use of molecular markers, such as intergenic spacer region (IGS) of 5S rDNA, appears to be necessary for the assessment of genetic homogeneity of *L. venetus* populations and for development of a rational strategy of this species' preservation. **Methods.** PCR amplification, cloning and sequencing of the 5S rDNA IGS of *L. venetus*. **Results.** It was found that two variants of 5S rDNA repeats are present in the genome of *L. venetus*. The IGS size is 158 and 162 bp, and the content of GC pairs amounts to 22,8–22,9 %. Typical for angiosperms RNA polymerase III promoter elements were detected in the IGS fragment preceding the 5S rRNA coding sequence. Among representatives of 17 genera of Fabaceae the highest level of IGS sequence similarity of 85,4–86,7 % was revealed between *L. venetus* and *Pisum sativum*, which belong to tribe Fabaeae. **Conclusions.** High variability of the 5S rDNA IGS makes them a convenient molecular marker for elucidation of phylogenetic relationships between genera and species of tribe Fabaeae.

Keywords: 5S rDNA, molecular markers, endangered species, *Lathyrus*.