

УДК 577.113.5:582.926.2

МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ 5S рДНК *BRUNFELSIA UNIFLORA* (POHL.) D. DON

А. Є. ШЕЛИФІСТ, Ю. О. ТИНКЕВИЧ, Р. А. ВОЛКОВ

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

Мета. 5S рДНК становить зручну модель для вивчення молекулярної еволюції тандемно організованих повторюваних послідовностей. Проте, у багатьох групах покритонасінних рослин ця ділянка геному все ще залишається вивченою фрагментарно. Так, у родині *Solanaceae* 5S рДНК охарактеризована лише для п'яти родів. Для того, щоб отримати уявлення про організацію 5S рДНК представників інших родів *Solanaceae*, було вирішено дослідити цю ділянку у *Brunfelsia uniflora* (триба *Petunieae*). **Методи.** ПЛР-ампліфікація, клонування та розшифрування нуклеотидної послідовності 5S рДНК. **Результати.** Сиквеновано три клоновані послідовності 5S рДНК *B. uniflora*. Встановлено, що у геномі *B. uniflora* присутній лише один клас повторів довжиною 343-347 нп. Рівень внутрішньогеномної подібності досліджених послідовностей ділянки міжгенного спейсера (МГС) 5S рДНК становить 86,7–96,4 %. МГС цього виду та інших представників родини *Solanaceae* суттєво відрізняються між собою: гомологію було виявлено лише у ділянках, необхідних для ініціації та термінації транскрипції РНК-полімерази III. **Висновки.** Молекулярна еволюція МГС 5S рДНК в родині *Solanaceae* відбувається з високою швидкістю. Відповідно, порівняння МГС варто використовувати для уточнення філогенетичних відносин між таксонами низького рангу, зокрема — між видами та родами триби *Petunieae*.

Ключові слова: 5S рДНК, міжгенний спейсер, молекулярна еволюція, *Brunfelsia*, *Solanaceae*.

Вступ. Повторювані послідовності являють собою основну фракцію геномів вищих рослин. Особливе місце серед них посідає рДНК — ділянки геному, які кодують рРНК. На відміну від більшості повторюваних послідовностей рДНК присутня у геномах всіх живих істот, оскільки вона виконує життєво необхідну функцію [1, 2]. У переважній більшості еукаріот 5S рДНК формують кластери з численних копій висококонсервативних кодуювальних ділянок довжиною 120 нп, розділених мінливими міжгенними спейсерами (МГС). Транскрипцію 5S рДНК забезпечує РНК-полімераза III [2–5].

Завдяки своїй універсальній будові та широкому розповсюдженню рДНК становить зручну модель для вивчення молекулярної еволюції тандемно організованих повторюваних послідовностей. Крім того, порівняння послідовностей рДНК, особливо внутрішніх транскрибованих спейсерів (internal transcribed spacer, ITS) 45S рДНК, широко використовується у молекулярній таксономії [6–10]. 5S рДНК також з успіхом застосовуються у таксономічних дослідженнях [3, 7, 11–14], але на загал набагато менше, ніж ITS 45S рДНК. Навіть для великих та економічно важливих родин 5S рДНК все ще залишається вивченою фрагментарно. Так, у родині *Solanaceae* 5S рДНК охарактеризована лише для п'яти родів [3, 15–18], чотири з яких належать до так званої кладки «x=12» — таксономічної групи, яка об'єднує рослини, що мають базове хромосомне число 12 [19]. Для того, щоб отримати уявлення про 5S рДНК представників інших груп *Solanaceae*, ми вирішили дослідити організацію цієї ділянки у *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don — представника широко розповсюдженого у Південній Америці роду *Brunfelsia* L. [20], та провести порівняльний аналіз особливостей її будови з відповідними ділянками інших представників родини *Solanaceae*.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження було свіже листя *B. uniflora*, отримане з Національного ботанічного саду імені М. М. Гришка НАН України. Загальну ДНК екстрагували згідно стандартної методики з використанням цетавлону в якості детергента [21].

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). З цією метою використовували пару універсальних праймерів 5S-14a-Ph (5'-GC-GAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3') і 5S-15-Ph (5'-GCTTAACTTCGGAGTTCTGATGGGA-3'), комплементарних до ділянки, що кодує 5S рРНК у дводольних рослин [3]. Застосування цих праймерів забезпечує ампліфікацію повного МГС та фланкувальних ділянок кодувальної послідовності за винятком 8 нп у її центральній частині — рис. 1. Наявність на 5'-кінці праймерів фосфатного залишку дозволяє збільшити ефективність лігування при клонуванні ПЛР-продуктів за тупим кінцем. Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила наступні компоненти: 10–30 нг ДНК, 1,0 од. акт. ДНК-полімерази (Phusion DNA polymerase, Thermo scientific), 1^x буфер для ПЛР, 0,1 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатів та по 0,5 мкМ кожного з праймерів. ПЛР проводилася з використанням ампліфікатора MiniCycler (MJ Research Inc, США) за програмою: (1) початкова денатурація ДНК — 95 °С, 2 хв; (2) денатурація ДНК — 95 °С, 45 с; (3) гібридизація праймерів — 58 °С, 40 с; (4) синтез ДНК — 72 °С, 1 хв; (5) закінчення ампліфікації — 72 °С, 8 хв; припинення реакції — 4 °С; загальна кількість циклів ампліфікації — 35. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофоретичного аналізу в 1,5 % агарозному гелі [22].

Отримані фрагменти ДНК лігували за фосфорильованими тупими кінцями у плазмідний вектор з використанням набору CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo scientific). Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL-blue продуктами лігування проводили методом елек-

тропорації з використанням приладу *E. coli* Pulser (BioRad, США). Колонії, які містили рекомбінантні плазміди, виявляли методом blue-white colony selection. Плазміди виділяли методом лужного лізису [22].

Наявність вставки у плазмідах перевіряли, застосовуючи ПЛР зі стандартними праймерами M13/pUC forward (For) та reverse (Rev), сайти гібридизації яких знаходяться в плазмідній ДНК по обидва боки від полілінкеру. Продукти ампліфікації, що містили вставки 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 [23]. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Clustal V [24], а пошук гомологічних послідовностей у Genbank — з використанням програми BLAST [25].

Результати та обговорення

Для ізоляції повторюваної ділянки 5S рДНК *B. uniflora* було застосовано ПЛР-ампліфікацію. Електрофоретичний аналіз отриманих ампліфікатів показав, що при проведенні ПЛР утворюється продукт довжиною близько 350 нп. Це вказує на присутність у геномі *B. uniflora* лише одного варіанту 5S рДНК за довжиною повтору. Клонування ПЛР-продуктів у плазмідний вектор та скринінг отриманих бактерій-трансформантів дозволили ідентифікувати вісім зразків, що містили інсerti 5S рДНК, три з яких були відібрані для подальшого сиквенування.

Комп'ютерний аналіз результатів сиквенування показав, що клоновані ампліфікати з обох кінців містять фрагменти кодувальної області, між якими знаходиться МГС. Виходячи із загальновідомої довжини кодувальної ділянки 5S рДНК еукаріот, яка становить 120 нп, була розрахована довжина повтору *B. uniflora*. Її значення для всіх досліджуваних зразків знаходяться у межах 343–347 нп. Незначна різниця у довжині повторів пов'язана з наявністю інсерцій/делецій окремих нуклеотидів у МГС (табл. 1, рис. 1).

Таблиця 1. Характеристика міжгенного спейсеру 5S рДНК видів родини Solanaceae

Назва виду	Назва клону	GenBank Асс. No	Довжина МГС, нп	Вміст GC-пар, %	Посилання
<i>Brunfelsia uniflora</i>	BfUn-5S-07	MH277104	227	35,24	Ця стаття
	BfUn-5S-21	MH277105	223	34,98	
	BfUn-5S-23	MH277106	225	34,22	
<i>Petunia hybrida</i>	HWH5a	X07930	341	41,94	[15]
<i>Nicotiana glauca</i>	Clone 4	AJ131171	312	33,33	[17]
<i>Capsicum baccatum</i>	---	AF217951	180	47,78	[16]
<i>Atropa belladonna</i>	Ab-5S-15	KF496933	138	34,06	[18]
<i>Solanum dulcamara</i>	Dulc 5S/1	AJ226026	219	57,53	[3]

Молекулярна організація 5S рДНК *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don

Для порівняльного аналізу організації МГС 5S рДНК *B. uniflora* нами були використані послідовності цієї ділянки з геномів інших представників родини Solanaceae, які представлені у Genbank (табл. 1). Встановлено, що довжина

МГС у *B. uniflora* знаходиться у межах середніх значень, тобто є типовою для представників цієї родини.

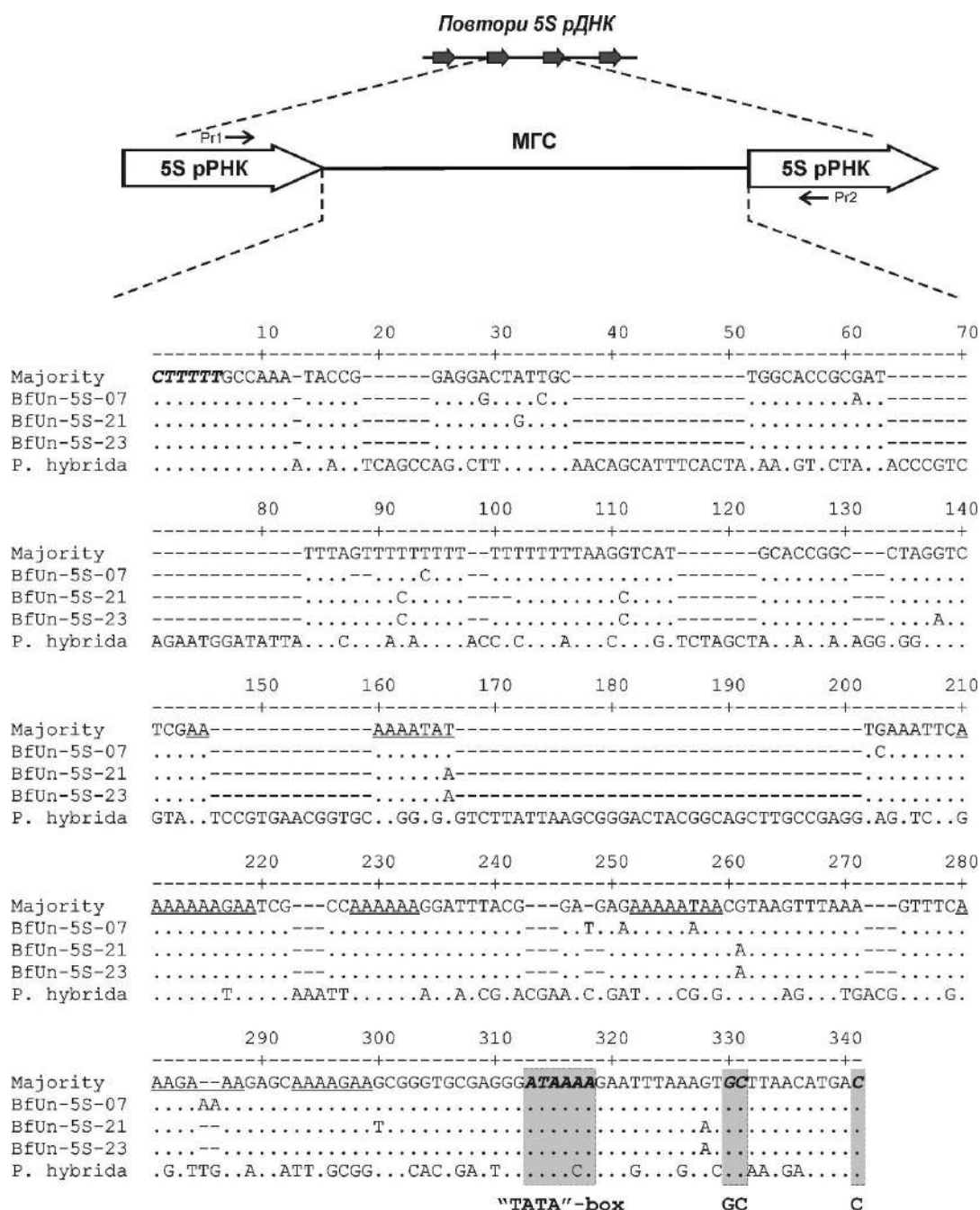


Рисунок 1. Структурна організація МГС 5S рДНК *Brunfelsia uniflora* (клони BfUn-5S-07, -21, -23) та *Petunia hybrida* (клон HWH5a). Pr1 та Pr2 — праймери 5S-14a та 5S-15, відповідно. Жирним курсивом виділено оліго-Т послідовність термінатора та передбачувані зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III. Підкреслено А-багаті олігонуклеотидні мотиви. Характеристики клонів наведено у табл. 1.

Розрахунок вмісту GC-пар у МГС показав, що у *B. uniflora* цей показник є порівняно низьким і знаходиться у межах від 34,22 до 35,24 %. Водночас, у деяких інших представників цієї ж родини вміст GC-пар у МГС є суттєво вищим і, зокрема, становить 47,78 % у *Capsicum baccatum* та 57,53 % у *Solanum dulcamara* (табл. 1). Раніше, в результаті вивчення молекулярної еволюції 45S рДНК антарктичного виду *Deschampsia antarctica*, було запропоновано гіпотезу, що існування рослин за низьких температур в умовах помірного чи холодного клімату мало би сприяти зниженню вмісту GC-пар у некодувальних ділянках геному для полегшення розходження ланцюгів ДНК під час реплікації. І, навпаки, в умовах тропічного клімату варто очікувати збільшення вмісту GC-пар [8]. Проте, отримані нами результати не підтверджують цю гіпотезу стосовно вмісту GC-пар в МГС 5S рДНК видів родини Solanaceae.

За допомогою вирівнювання отриманих послідовностей було встановлено, що рівень подібності МГС 5S рДНК у геномі *B. uniflora* знаходиться у межах 86,7–96,4 % (табл. 2). Відмінності, виявлені у кожному з розшифрованих МГС порівняно з консенсусною послідовністю, є наслідком кількох транзицій та трансверсій (рис. 1). Зокрема, у межах МГС клонів BfUn-5S-07 та -21 виявлено по п'ять транзицій і по дві трансверсії, тоді як у BfUn-5S-23 на одну транзицію менше. При порівнянні частоти наявних транзицій було встановлено, що серед них найчастіше — майже половина всіх випадків — зустрічається заміна G→A, що може бути наслідком дезамінування 5-метилцитозину та його перетворенням у тимін (C→T) в антисенс-ланцюгу 5S рДНК. Аналогічна тенденція була попередньо виявлена у нашій лабораторії для 5S рДНК *Atropa belladonna* [18].

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

1	2	3	4	5	6	7	8	No	Вид, клон
100	88.8	86.7	41.4	35.7	33.3	26.8	21.9	1	<i>B. uniflora</i> , BfUn-5S-07
	100	96.4	41.7	33.6	28.9	28.3	20.5	2	<i>B. uniflora</i> , BfUn-5S-21
		100	43.6	33.3	35.6	27.5	20.5	3	<i>B. uniflora</i> , BfUn-5S-23
			100	37.2	31.1	29.0	31.1	4	<i>P. hybrida</i> , HWH5a
				100	30.6	33.3	24.7	5	<i>N. sylvestris</i> , clone 4
					100	42.8	31.7	6	<i>C. baccatum</i>
						100	42.8	7	<i>A. belladonna</i> , Ab-5S-15
							100	8	<i>S. dulcamara</i> , Dulc 5S/1

Порівняння отриманих нами послідовностей із даними, наявними у Genbank, показало, що МГС 5S рДНК *B. uniflora* має низький рівень подібності з МГС досліджених на сьогодні представників родини Solanaceae (табл. 2). Зокрема, найвищий рівень подібності — 41,4–43,6 % — був виявлений із МГС *Petunia hybrida*, тоді як із представниками інших родів подібність МГС *B. uniflora* не перевищувала 35,7 %. Ці спостереження добре узгоджуються з сучасними таксономічними уявленнями, які ґрунтуються на порівнянні послідовностей хлДНК [19].

Встановлено, що найбільший рівень подібності у представників різних родів родини Solanaceae спостерігається на початку та в кінці МГС (рис. 1, 2). Як відомо, у рослин МГС 5S рДНК містить послідовності, необхідні для

роботи РНК-полімерази III, а саме — сигнал термінації транскрипції та зовнішні елементи промотора. Зокрема, функцію термінатора транскрипції виконує оліго-Т мотив, що безпосередньо межує з 3'-кінцем кодувальної ділянки 5S рДНК [4]. Аналогічна ділянка присутня в МГС 5S рДНК *B. uniflora* (рис. 1) та інших представників родини Solanaceae [3, 15–18]. Проведене нами порівняння послідовностей МГС також показує, що на відстані кількох десятків нуклеотидів від термінатора транскрипції у МГС всіх порівнюваних видів присутня Т-багата ділянка (рис. 1, 2), відносна консервативність якої може вказувати на її функціональне значення. Можна припустити, що ця ділянка може бути задіяна у термінації транскрипції як додатковий або «запасний» термінатор.

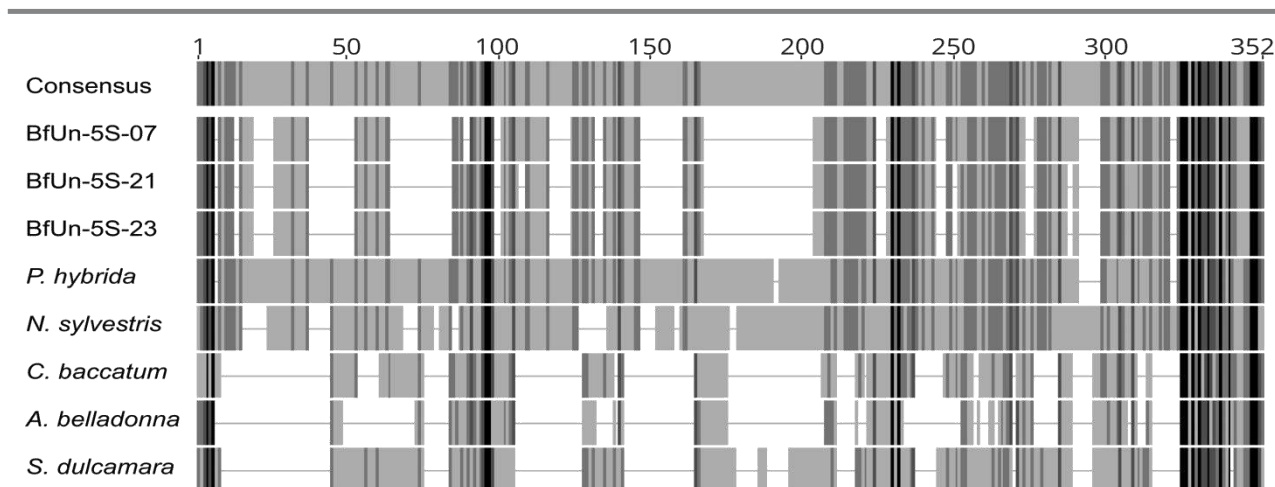


Рисунок 2. Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей МГС 5S рДНК клонів *Brunfelsia uniflora* (BfUn-5S-07, -21, -23) та деяких представників родини Solanaceae: *Petunia hybrida* (GenBank Acc. No X07930), *Nicotiana sylvestris* (AJ131171), *Capsicum baccatum* (AF217951), *Atropa belladonna* (KF496933), *Solanum dulcamara* (AJ226026). Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: — менше 50 %, — 60–80 %, — 80–100 %, — 100 %.

В *Arabidopsis thaliana* зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III представлені трьома мотивами: шестинуклеотидним ТАТА-боксом, GC та C, розміщеними відповідно у позиціях -28, -13 та -1 нп від 5'-кінця кодувальної ділянки 5S рДНК [4]. Подібні мотиви виявлені й у МГС *B. uniflora*. Так, у позиції -29 знаходиться послідовність АТАААА, а у позиціях -12 та -1 присутні мотиви GC і C. Водночас, на відміну від *B. uniflora*, у петунії в позиції -25 наявний цитозин. Ці данні доповнюють попередні спостереження нашої лабораторії, згідно яких нуклеотидна послідовність ТАТА-боксу у покритонасінних рослин може зазнавати певних змін, однак основною її властивістю залишається переважна наявність аденіну та тиміну [26–28].

Аналіз отриманих сиквенсів також показує, що у МГС *B. uniflora* наявні шість А-багатих олігонуклеотидних мотивів довжиною від 6 до 10 нп. Імовірним механізмом їх виникнення може бути ампліфікація єдиної батьківської послідовності з подальшим накопиченням нуклеотидних замінів. Короткі повторювані мотиви, які відрізняються між собою за послідовністю, було раніше знайдено у МГС інших дводольних рослин [3, 26–28].

Висновки

У геномі *B. uniflora* присутній один клас повторів 5S рДНК довжиною 343–347 нп. МГС 5S рДНК цього виду та інших представників родини Solanaceae, зокрема тих, що належать до класу «x=12», суттєво відрізняються між собою: гомологію виявлено лише у ділянках, в яких розміщені зовнішні регуляторні елементи РНК-полімерази III. Це свідчить на користь того, що порівняння МГС варто використовувати для уточнення філогенетичних відносин між таксонами низького рангу, зокрема — між видами та родами триби Petunieae.

Подяка

Автори висловлюють подяку канд. біол. наук М. Б. Гапоненко (Національний ботанічний сад імені М. М. Гришка НАН України) за наданий для досліджень матеріал.

Перелік літератури

1. 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.
2. Volkov R. A., Medina F. J., Zentgraf U., Hemleben V. Molecular cell biology: Organization and molecular evolution of rDNA, nucleolar dominance, and nucleolus structure. *Prog. Bot.* 2004. Vol. 65. P. 106–146.
3. 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.
4. 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: 10.1038/sj.hdy.6800964
 5. Layat E., Sáez-Vásquez 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. 267–76. doi: 10.1093/pcp/pcr177
 6. King K., Torres R. A., Zentgraf U., Hemleben V. Molecular evolution of the intergenic spacer in the nuclear ribosomal RNA genes of Cucurbitaceae. *J. Mol. Evol.* 1993. Vol.36. P. 144–152.
 7. 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.
 8. Volkov R. A., Kozeretska I. A., Kyryachenko S. S. et al. Molecular evolution and variability of ITS1 and ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the Maritime Antarctic. *Polar Sci.* 2010. Vol. 4, No 3. P. 469–478. doi: 10.1016/j.polar.2010.04.011
 9. Poczaí P., Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Mol. Biol. Rep.* 2010. Vol. 37, No 4. P. 1897–1912. doi: 10.1007/s11033-009-9630-3
 10. Zeng Q., Chen H., Zhang C. et al. Definition of eight mulberry species in the genus *Morus* by internal transcribed spacer-based phylogeny. *PloS one.* 2015. Vol. 10, No 8. P. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0135411
 11. Baum B. R., Bailey L. G., Belyayev A. et al. The utility of the nontranscribed spacer of 5S rDNA units grouped into unit classes assigned to haplomes — a test on cultivated wheat and wheat progenitors. *Genome.* 2004. Vol. 47, No 3. P. 590-599. doi:10.1139/g03-146
 12. Saini A, Jawali N. Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* 2009. Vol. 280. P. 187–206. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4
 13. Volkov A. R., Panchuk I. I. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* 2014. Т. 12, № 1. С. 3–11.
 14. Mlinarec J., Franjević D., Vočkor L., Besendorfer V. Diverse evolutionary pathways shaped 5S rDNA of species of tribe *Anemoneae* (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Bot. J. Linn. Soc.* 2016. Vol. 182, No 1. P. 80–99. doi: 10.1111/boj.12452
 15. Frasch M., Wenzel W., Hess D. The nucleotide sequences of nuclear 5S rRNA genes and spacer regions of *Petunia hybrida*. *Nucleic Acids Res.* 1989. Vol. 17, No 7. — P. 2857.
 16. Park Y. K., Park K. C., Park C. H., Kim N. S. Chromosomal localization and sequence variation of 5S rRNA gene in five *Capsicum* species. *Mol. Cells.* 2000. Vol. 10, No 1. P. 18–24.
 17. 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, No 1. P. 19–25. doi: 10.1038/sj.hdy.6800001
 18. 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 Biology.* 2017. Vol.17, No 1:21. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6
 19. Olmstead R. G., Bohs L., Migid H. A. et al. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon.* 2008. Vol. 57, No 4. P. 1159–1181.
 20. Filipowicz N., Renner S. S. *Brunfelsia* (Solanaceae): A genus evenly divided between South America and radiations on Cuba and other Antillean islands. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2012. Vol. 64. P. 1–11. doi: 10.1016/j.ympev.2012.02.026
 21. 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
 22. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. — 1626 p.
 23. DNASTAR, 1998. MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
 24. 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
 25. 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.
 26. Tynkevich Y. O., Volkov R. A. Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* 2014. Vol. 48, No 1. P. 3–9. doi: 10.3103/S009545271401009
 27. 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, № 12. С. 81–87.
 28. Русак О. О., Петращук В. І., Панчук І. І., Волков Р. А. Молекулярна організація 5S рДНК двох українських популяцій явора (*Acer pseudo-platanus*). *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* 2016. Т. 14, № 2. С. 216–220.

References

- 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.
- Volkov R. A., Medina F. J., Zentgraf U., Hemleben V. Molecular cell biology: Organization and molecular evolution of rDNA, nucleolar dominance, and nucleolus structure. *Prog. Bot.* 2004. Vol. 65. P. 106–146.
- 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.
- 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: 10.1038/sj.hdy.6800964
- Layat E., Sáez-Vásquez 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
- King K., Torres R.A., Zentgraf U., Hemleben V. Molecular evolution of the intergenic spacer in the nuclear ribosomal RNA genes of Cucurbitaceae. *J. Mol. Evol.* 1993. Vol.36. P. 144–152.
- 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.
- Volkov R. A., Kozeretka I. A., Kyryachenko S. S. et al. Molecular evolution and variability of ITS1 and ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the Maritime Antarctic. *Polar Sci.* 2010. Vol. 4, No 3. P. 469–478. doi: 10.1016/j.polar.2010.04.011
- Poczai P., Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Mol. Biol. Rep.* 2010. Vol. 37, No 4. P. 1897–1912. doi: 10.1007/s11033-009-9630-3
- Zeng Q., Chen H., Zhang C. et al. Definition of eight mulberry species in the genus *Morus* by internal transcribed spacer-based phylogeny. *PLoS one.* 2015. Vol. 10, No 8. P. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0135411
- Baum B. R., Bailey L. G., Belyayev A. et al. The utility of the nontranscribed spacer of 5S rDNA units grouped into unit classes assigned to haplomes — a test on cultivated wheat and wheat progenitors. *Genome.* 2004. Vol. 47, No 3. P. 590–599. doi:10.1139/g03-146
- Saini A, Jawali N. Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* 2009. Vol. 280. P. 187–206. doi 10.1007/s00606-009-0178-4
- Volkov R. A., Panchuk I. I. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine.* 2014. Vol. 12, No 1. P. 3–11.
- Mlinarec J., Franjević D., Bočkor L., Besendorfer V. Diverse evolutionary pathways shaped 5S rDNA of species of tribe *Anemoneae* (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Bot. J. Linn. Soc.* 2016. Vol. 182, No 1. P. 80–99. doi:10.1111/boj.12452
- Frasch M., Wenzel W., Hess D. The nucleotide sequences of nuclear 5S rRNA genes and spacer regions of *Petunia hybrida*. *Nucleic Acids Res.* 1989. Vol. 17, No 7. P. 2857.
- Park Y. K., Park K. C., Park C. H., Kim N. S. Chromosomal localization and sequence variation of 5S rRNA gene in five *Capsicum* species. *Mol. Cells.* 2000. Vol. 10, No 1. P. 18–24.
- 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, No 1. P. 19–25. doi: 10.1038/sj.hdy.6800001
- 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 Biology.* 2017. Vol.17, No 1:21. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6
- Olmstead R. G., Bohs L., Migid H. A. et al. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon.* 2008. Vol. 57, No 4. P. 1159–1181.
- Filipowicz N., Renner S. S. *Brunfelsia* (Solanaceae): A genus evenly divided between South America and radiations on Cuba and other Antillean islands. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2012. Vol. 64. P. 1–11. doi: 10.1016/j.ympev.2012.02.026
- 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
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. — 1626 p.
- DNASTAR, 1998. MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
- 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
- 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.
- Tynkevich Y. O., Volkov R. A. Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* 2014. Vol. 48, No 1. P. 3–9. doi: 10.3103/S009545271401009
- Tynkevich Y. O., Nevelska A. O., Chorney I. I., Volkov R. A. Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine.* 2015. Vol. 13, No 12. P. 81–87.

28. Rusak O. O., Petrashchuk V. I., Panchuk I. I., Volkov R. A. Molecular organization of 5S rDNA in two ukrainian populations of sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2016. Vol. 14, No 2. P. 216–220.

Представлено І. О. Андрєєвим
Надійшла 18.04.2018

MOLECULAR ORGANIZATION OF 5S rDNA OF *BRUNFELSIA UNIFLORA* (POHL.) D. DON

A. Y. Shelyfist, Y. O. Tynkevich, R. A. Volkov

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

Aim. The 5S rDNA represents a convenient model for studying of the molecular evolution of tandemly arranged repeated sequences. However, in many groups of angiosperms this genomic region still remains poorly studied. So far, in the family Solanaceae the 5S rDNA was described only for five genera. In order to elucidate

the 5S rDNA organization in representatives of other genera of Solanaceae, we decided to explore organization of this region in *Brunfelsia uniflora* (tribe Petunieae). **Methods.** PCR amplification, cloning and sequencing of 5S rDNA. **Results.** Three clones of 5S rDNA of *Brunfelsia uniflora* were sequenced. It was found that only one class of repeats ranging in length from 343 to 347 bp is present in the genome of *B. uniflora*. The level of intragenomic similarity for the 5S rDNA intergeneric spacer regions (IGS) ranges from 86.7 to 96.4 %. The IGSs of *B. uniflora* and of other members of Solanaceae family differ significantly: the sequence homology was detected only for sequence motives required for RNA polymerase III transcription initiation and termination. **Conclusions.** The molecular evolution of the 5S rDNA IGS occurs at a high rate in the Solanaceae family. Accordingly, the comparison of the IGS should be used to clarify the phylogenetic relationship between taxa of low rank, in particular between species and genera of the tribe Petunieae.

Keywords: 5S rDNA, intergeneric spacer, molecular evolution, *Brunfelsia*, Solanaceae.