

## ОРГАНІЗАЦІЯ ПОВТОРЮВАНОЇ ДІЛЯНКИ 5S рДНК *QUERCUS IMBRICARIA* МІСНХ.

А. С. СТРАТІЙЧУК, Т. О. ДЕРЕВЕНКО, Ю. О. ТИНКЕВИЧ

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

**Мета.** Ділянки 5S рДНК являють собою зручну модель для вивчення еволюції повторюваних послідовностей. Крім того, порівняння 5S рДНК було успішно використано для з'ясування філогенетичних відносин між близько спорідненими видами рослин. Проте, на сьогодні практично відсутні дані щодо організації повторів 5S рДНК у представників секції *Lobatae* — однієї з найбільших груп роду *Quercus*. Відповідно, нашою метою було дослідити організацію 5S рДНК *Q. imbricaria* — виду, що належить до цієї секції. **Методи.** Виділення ДНК, ПЛР-ампліфікація, клонування та сиквенування. **Результати.** Клоновано та сиквенувано повну повторювану ділянку 5S рДНК. Виявлено, що у геномі дубів кодувальна ділянка 5S рДНК містить 5 нуклеотидних заміни порівняно з такою у арабідопсису. Проте, вторинна структура гіпотетичного транскрипту зберігає всі типові особливості 5S рРНК. У міжгенному спейсері (IGS) були виявлені потенційні елементи зовнішнього промотору. **Висновки.** Присутні у 5S рРНК нуклеотидні заміни виникли в ході еволюції як компенсаторні, що призводить до збереження її вторинної структури. Завдяки суттєвим відмінностям між видами різних секцій, IGS 5S рДНК можна застосувати для таксономічних досліджень у роді *Quercus*.

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

**Вступ.** У рослин на гаплоїдний набір хромосом може припадати один або декілька локусів 5S рДНК. Кожен з цих локусів містить від сотень до тисяч повторюваних одиниць (Cloix et al., 2000; Navrotska et al. 2018; Ibiapino et al. 2019; Pastova et al. 2019). Ці одиниці організовані як тандемні повтори кодувальної ділянки та міжгенного спейсера (intergenic spacer, IGS) (Volkov et al., 2003). Кодувальна ділянка 5S рДНК є еволюційно консервативною, що необхідно для збереження функції 5S рРНК у складі рибосоми (Barciszewska et al., 2001). Крім того, у кодувальній ділянці містяться елементи внутрішнього промотора РНК полімерази III: А-бокс, внутрішній елемент (internal element, IE) і С-бокс (Douet et al., 2007; Layat et al., 2012). На противагу цьому, IGS є еволюційно мінливим, оскільки він не транскрибується та більша його частина не виконує регуляторних функцій. Тим не менш, у IGS покритонасінних рослин виявлені відносно консервативні елементи, які потрібні для ініціації (зовнішні промоторні елементи) та термінації (термінатор) транскрипції (Venkateswarlu et al., 1991; Fulnecsek et al., 2002; Cloix et al., 2003, de Souza et al., 2019). Універсальна структурна організація та висока еволюційна мінливість IGS робить цю ділянку зручним інструментом для вивчення закономірностей молекулярної еволюції та з'ясування філогенетичних відносин таксонів низького рангу (Volkov et al., 2001; Saini et al., 2009; Mlinarec et al., 2016; Bolsheva et al., 2017). Проте, для багатьох груп рослин молекулярна організація 5S рДНК залишається недостатньо вивченою. Серед таких груп і один з найбільших родів деревних рослин — рід *Quercus* (дуб). Згідно сучасних даних, рід *Quercus* поділяють на 2 підроди, *Quercus* та *Cerris*, які включають 5 і 3 секцій, відповідно (Denk et al., 2017). Найбільше видове різноманіття спостерігається у дубів Північної Америки та Південної Азії (Denk et al., 2017; Hipp et al., 2019).

© А. С. СТРАТІЙЧУК, Т. О. ДЕРЕВЕНКО, Ю. О. ТИНКЕВИЧ, 2019

Проте, наявні дані про організацію генів 5S рРНК відносяться виключно до дубів західної Європи (Denk, Grimm, 2010; Simeone et al., 2018). В той же час, особливої уваги заслуговує ендемічна група північноамериканських дубів — секція *Lobatae* (так звані «Червоні дуби»). Не дивлячись на важливе значення, як в екосистемах Північної Америки, так і в господарській діяльності людини (Wright, Jones, 2006), ця група все ще залишається найменш охопленою дослідженнями із використанням молекулярно-генетичних методів. В даній роботі ми аналізуємо молекулярну організацію 5S рДНК представника секції *Lobatae* — *Q. imbricaria*.

### Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження був зразок *Q. imbricaria* з дендрарію Ботанічного саду Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. Загальну ДНК екстрагували зі свіжого листа згідно стандартної методики із використанням цетавлону як лізуючого агенту (Porebski et al., 1997; Панчук, Волков, 2007).

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), використовуючи праймери 5S-L і 5S-R, які мають послідовність, комплементарну до кодувальної ділянки 5S рДНК:

5'-GCCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3' та 5'-GCTTAACTTCGGAGTTCTGATGGGA-3', відповідно. Застосування цих праймерів забезпечує ампліфікацію повного міжгенного спейсера та фланкуючих ділянок кодувальної послідовності 5S рДНК у видів, які належать до таксономічно віддалених родин Покритонасінних (Тинкевич та ін., 2014; Тинкевич та ін., 2015; Русак та ін., 2016; Volkov et al., 2017; Шелифіст та ін., 2018; Ishchenko et al., 2018).

Реакційна суміш для ПЛР загальним об'ємом 20 мкл містила такі компоненти: 10 нг ДНК, 1 одиниця полімерази MyTaq (Bioline), 10 × полімеразний буфер та 0.5 мкМ кожного з двох праймерів. ПЛР проводилася з використанням ампліфікатора BioRad T100 (BioRad, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази та денатурація ДНК — 95 °С, 3 хв; (2) денатурація ДНК — 95 °С, 15 с; (3) гібридизація праймерів — 61 °С, 15 с; (4) синтез ДНК — 72 °С, 10 с; (5) закінчення ампліфікації — 72 °С, 8 хв; припинення реакції — 4 °С; загальна кількість циклів ампліфікації — 35. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофоретичного розділення у 2 % агарозному гелі. Отриманий ПЛР-продукт лігували у плазмідний вектор pJET

1.2, використовуючи набір реактивів CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США) згідно з інструкціями виробника. Далі вектор зі вставкою трансформували в клітини *E. coli* лінії XL1-Blue методом електропорації, використовуючи прилад *E. coli* Pulsher (BioRad, США). Колонії із рекомбінатною плазмідною виявляли за резистентністю до ампіциліну.

Наявність вставки у плазмідах підтверджували методом ПЛР-ампліфікації із праймерами pJET1.2 Forward та pJET1.2 Reverse, які гібридизуються з векторною ДНК з обох боків від полілінкеру. Рекомбінантні плазміди виділяли методом лужного лізису (Sambrook et al., 1989). Отриманий клон був сиквенований на фірмі Genewiz (США).

Полінуклеотидні послідовності аналізували за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм DNASTAR. Пошук гомологічних послідовностей для порівняння проводився у базі даних Genbank, використовуючи програму BLAST (Altschul et al., 1997). Моделі вторинних структур 5S рРНК будували з використанням програми RNAstructure (Turner, Mathews, 2009).

### Результати та обговорення

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації 5S рДНК *Q. imbricaria* показав, що для даного зразка утворюється декілька ПЛР-продуктів з довжинами приблизно 320 нп, 640 нп та 960 нп. Оскільки довжина цих продуктів є кратною 320, це свідчить про ампліфікацію мономеру, димеру та тримеру повторів 5S рДНК.

Після клонування ПЛР-продуктів за допомогою плазмідного вектору було відібрано вісім резистентних до ампіциліну колоній *E. coli*. Використовуючи ПЛР-ампліфікацію клонованої ділянки та електрофоретичне визначення довжини отриманих ПЛР-фрагментів було показано, що у більшості випадків в плазмідах міститься вставка з двох повторів 5S рДНК (димер). Один з таких клонів був обраний для сиквенування.

Аналіз отриманої послідовності показав, що вставка рекомбінантної плазміді складається з наступних ділянок: фрагмент кодувальної ділянки 5S рДНК, повний міжгенний спейсер, повна кодувальна ділянка та частково просиквенований другий міжгенний спейсер. Було встановлено, що довжина повної послідовності IGS становить 217 нп, тоді як кодувальна ділянка має типову для рослин довжину — 120 нп (Barciszewska et al., 2001; Wicke et al., 2011).

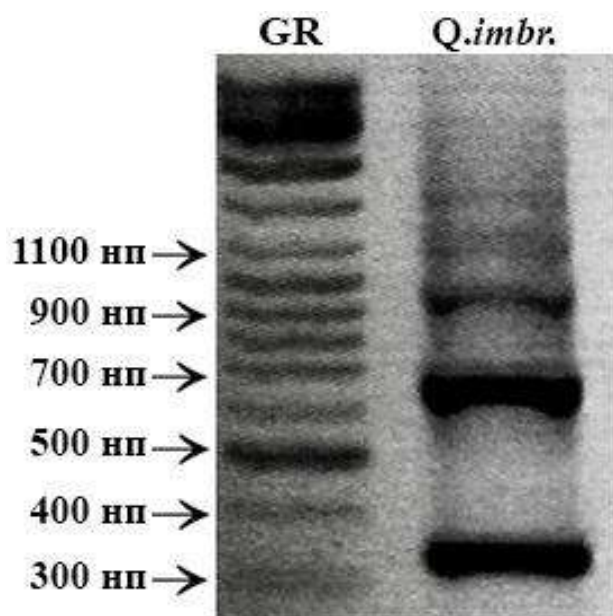


Рис. 1. Електрофоретичне розділення ПЛР-продуктів 5S рДНК *Q. imbricaria*. GR — електрофоретичний маркер GeneRuler 100bp, Q. imbr — ПЛР продукт 5S рДНК *Q. imbricaria*.

Порівняння отриманої нами послідовності кодувальної ділянки 5S рДНК *Q. imbricaria* із кодувальною ділянкою 5S рДНК для модельного виду *Arabidopsis thaliana*, послідовність якої наявна у Genbank (Асс. No AJ307348.2), виявило різницю у 5 нуклеотидних замін. Враховуючи, що 5S рРНК є високо консервативною, ми вирішили перевірити, чи отримана нами послідовність кодувальної ділянки 5S рДНК *Q. imbricaria* не являє собою псевдоген. З цією метою були обраховані та порівняні між собою прогнозовані вторинні структури (Turner, Mathews, 2009) 5S рРНК *Q. imbricaria* та *A. thaliana* (Cloix, Tutois, 2010; Douet, Tourmente, 2007; Simon et al., 2018). Отримані моделі (рис. 2) показують наявність всіх типових структурних елементів (Barciszewska et al., 2001) та високу подібність для обох видів. Отже, ми вважаємо, що сиквенована ділянка кодує функціонально активну 5S рРНК *Q. imbricaria*. Ці результати також свідчать, що заміни окремих нуклеотидів, які протягом еволюції з'являлись у кодувальній ділянці, мали компенсаторний характер.

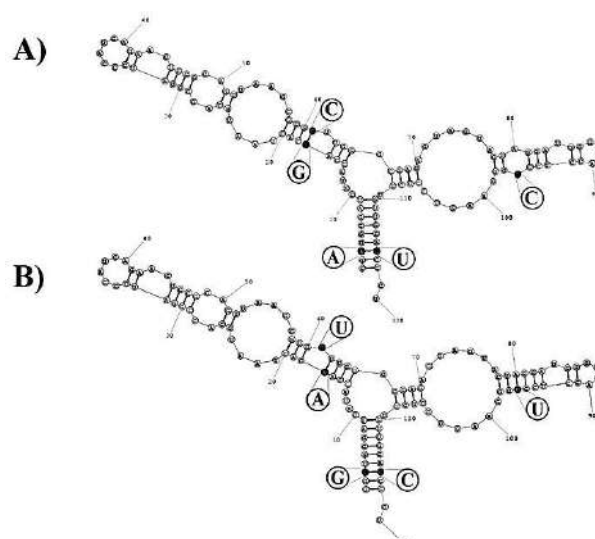


Рис. 2. Прогнозовані вторинні структури 5S рРНК *Arabidopsis thaliana* (А) та *Quercus imbricaria* (В). Виділено 5 нуклеотидних замін між послідовностями рРНК обох видів.

Послідовність IGS 5S рДНК *Q. imbricaria* було порівняно з послідовностями IGS інших представників роду *Quercus*, які наявні у базі даних Genbank (в дужках вказаний номер доступу в базі), або отримані нами раніше. Зокрема, для порівняння ми обрали ще одного представника тієї ж секції *Lobatae* — *Q. texana* Buckley (MN124992) (Tynkevich, Volkov, 2019), а також по одному представнику чотирьох основних секцій роду, а саме: з секції *Quercus* — *Q. robur* L. (FM243373.1), *Cerris* — *Q. cerris* L. (LT971465.1), *Ilex* — *Q. ilex* L. (FM243809.1) та *Cyclobalanopsis* — *Q. glauca* THUNB. (MN124991) (Denk, Grimm, 2010; Simeone et al., 2018). Порівняльний аналіз обраних послідовностей показав, що представники секції *Lobatae* та *Quercus* мають відносно меншу довжину IGS 5S рДНК — 217 нп у *Q. imbricaria* і *Q. texana* та 230 нп у *Q. robur*, тоді як у видів інших секцій довжина IGS сягає 319, 316 та 328 нп у *Q. cerris*, *Q. ilex* та *Q. glauca*, відповідно. Така різниця викликана наявністю довгих інсерцій / делецій (рис. 3).

У IGS було виявлено мотиви, які відповідають зовнішнім регуляторним елементам промотора 5S рРНК (Douet, Tourmente, 2007; Simon et al., 2018; de Souza et al., 2019). До таких елементів належать АТ-збагачена ділянка («ТАТА»-бокс), яка у роді *Quercus* має вигляд ТТТАТАА (за винятком *Q. ilex*: в геномі цього виду є два варіанти повторів 5S рДНК, які мають звичайну АТ-збагачену ділянку, або змінену — ТТТГТАА). Ця ділянка розміщена на 3' кінці IGS у позиції -30 нп від 5' кінця кодувальної ділянки. Крім того, було ідентифіко-

вано інший відомий елемент промотора — мотив GC у позиції -14 нп. У позиції -1, яка також задіяна в ініціації транскрипції, у всіх представників роду *Quercus* присутній нуклеотид Т, тоді як у *A. thaliana* та представників багатьох інших родів покритонасінних тут знаходиться нуклеотид С (Cloix, Tutois, 2000; Volkov, Panchuk, 2014; Тынкевич, Volkov, 2015; Тынкевич et al., 2015; Shelyfist et al., 2018; Ishchenko et al., 2018).

Також безпосередньо після 3' кінця кодувальної ділянки на початку IGS були виявлені мотиви, які, імовірно, виконують функцію термінатора транскрипції (Douet, Tourmente, 2007; Тынкевич, Volkov, 2019; de Souza et al., 2019): оліго-Т послідовності, якими починаються дві копії довгих тандемних субповторів (рис. 3).

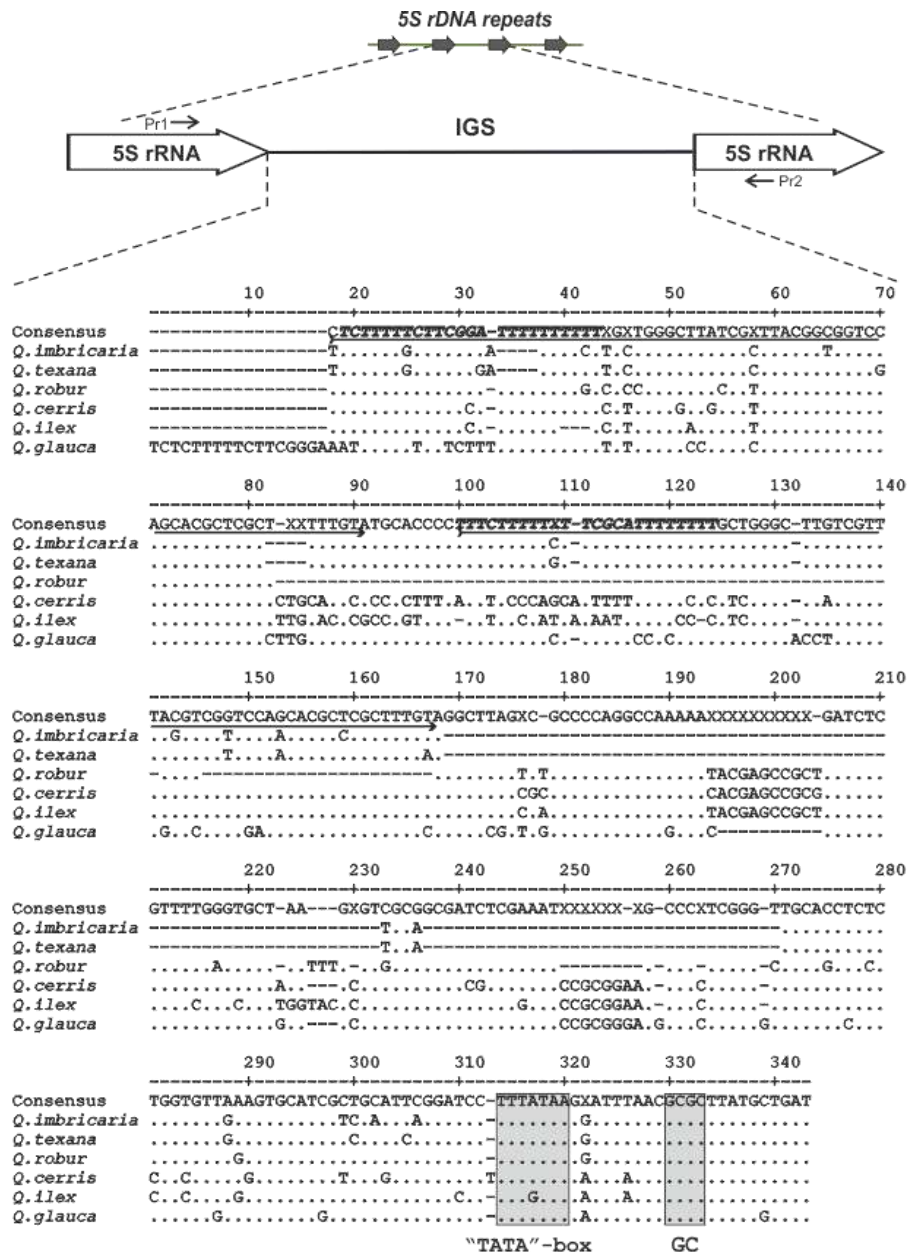


Рис. 3. Структурна організація міжгенного спейсера 5S рДНК видів роду *Quercus*. Pr1 та Pr2 — праймери 5S-L та 5S-R, відповідно. Виділено потенційні зовнішні елементи промотора; жирним курсивом виділено оліго-Т послідовність термінатора; стрілками позначено розташування субповторів у IGS.



На основі вирівнювання IGS різних видів роду *Quercus* був обрахований рівень подібності між ними (таб. 1). Між видами, що належать до секції *Lobatae* — *Q. imbricaria* та *Q. texana* — рівень подібності сягає 94,5 %, що підтверджує

існуючі уявлення про приналежність цих двох видів до однієї секції. Водночас між видами з різних секцій подібність IGS є суттєво нижчою та коливається в межах від 56,7 до 78,5 %.

Таблиця 1. Рівень подібності (%) нуклеотидної послідовності IGS 5S рДНК видів роду *Quercus*

Вид-клон	<i>Q. imbricaria</i>	<i>Q. texana</i>	<i>Q. robur</i>	<i>Q. cerris</i>	<i>Q. ilex</i>	<i>Q. glauca</i>
<i>Q. imbricaria</i>	100	94,5	56,7	72,4	72,4	71,9
<i>Q. texana</i>		100	58,5	72,4	73,7	75,1
<i>Q. robur</i>			100	77,0	78,3	65,7
<i>Q. cerris</i>				100	78,5	67,7
<i>Q. ilex</i>					100	65,5
<i>Q. glauca</i>						100

### Висновки

Заміни нуклеотидів, які протягом еволюції виникають у кодувальній ділянці 5S рДНК, мають компенсаторний характер і не порушують вторинну структуру 5S рРНК. В IGS 5S рДНК видів роду *Quercus* присутні структурні особливості, які дозволяють чітко відрізнити представників різних секцій. Завдяки значній мінливості у межах роду *Quercus*, IGS 5S рДНК має великий потенціал для використання у внутрішньородових таксономічних дослідженнях.

**Подяка.** Автори висловлюють подяку проф. Р. А. Волкову (Чернівецький національний університет) за участь у обговоренні отриманих результатів.

**Фінансування.** Дослідження проводилися за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (грант № 0118U000137).

### Перелік літератури

1. Панчук І. І., Волков Р. А. Практикум з молекулярної генетики. Чернівці: Рута. 2007. 120 с.
2. Русак О. О., Петрашук 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. Том 14, № 2. С. 216–220.
3. Тинкевич Ю. О., Волков Р. А. Новий структурний клас 5S рДНК *Rosa wichurana* Среп. Довіді Національної академії наук України. 2014. № 5. С. 143–148.
4. 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. Том 13, № 1. С. 81–87.

5. Шелифіст А. Є., Тинкевич Ю. О., Волков Р. А. Молекулярна організація 5S рДНК *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2018. Том 16, № 1. С. 61–68.
6. 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, No 17. P. 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
7. 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.
8. Bolsheva N. L., Melnikova N. V., Kirov I. V., Speranskaya A. S., Krinitsina A. A., Dmitriev A. A., Rozhmina T. A. Evolution of blue-flowered species of genus *Linum* based on high-throughput sequencing of ribosomal RNA genes. *BMC Evol. Biol.* 2017. Vol. 17, No 2. P. 23–36. doi:10.1186/s12862-017-1105-x.
9. 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
10. Cloix C., Yukawa Y., Tutois S., Sugiura M., Tourment S. *In vitro* analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant J.* 2003. Vol. 35. P. 251–226. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2003.01793.x
11. Denk T., Grimm G. W. The oaks of western Eurasia: traditional classifications and evidence from two nuclear markers. *Taxon.* 2010. Vol. 59, No 2, P. 351–66. doi: 10.1002/tax.592002.
12. 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
13. de Souza T. B. Gaeta, M. L., Martins, C., Vanzela A. L. L. IGS sequences in *Cestrum* present AT- and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol. Biol. Reports*. 2019. P. 1–12. doi: 10.1007/s11033-019-05104-y
  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. doi: org/10.1038/sj.hdy.6800964
  15. Fulnecek J., Lim K. Y., Leitch A. R., Kovarik A., Matyásek R. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity*. 2002. Vol. 88. P. 19–25. doi: 10.1038/sj.hdy.6800001
  16. Hipp A. L., Manos P. S., Hahn M., Avishai M., Bodénès C., Cavender-Bares J., Crowl A., Deng M., Denk T., Fitz-Gibbon S., Gailing O., González-Elizondo M. S., González-Rodríguez A., Grimm G. W., Jiang X.-L., Kremer A., Lesur I., McVay J. D., Plomion C., Rodríguez-Correa H., Schulze E.-D., Simeone M. C., Sork V. L., Valencia-Avalos S. Genomic landscape of the global oak phylogeny. *bioRxiv*. 2019. P. 587253. doi: 10.1101/587253
  17. Ibiapino A., García M. A., Ferraz M. E., Costea M., Stefanovic S., Guerra M. Allopolyploid origin and genome differentiation of the parasitic species *Cuscuta veatchii* (Convolvulaceae) revealed by genomic in situ hybridization. *Genome*. 2019. Vol. 62, No 7. P. 467–475. doi: 10.1139/gen-2018-0184
  18. Ishchenko O. O., Panchuk I. I., Andreev I. O., Kunakh V. A., Volkov R. A. Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol. Genet.* 2018. Vol. 52. No 6. P. 416–21. doi: 10.3103/S0095452719010146.
  19. Layat E., Saez-Vasquez J., Tourmente S. Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2012. Vol. 53, No 2. P. 267–276. doi:10.1093/pcp/pcr177.
  20. Mlinarec J., Franjevic D., Bockor 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.
  21. Navrotska D., Andreev I., Betekhtin A. Rojek M., Parnikoza I., Myryuta G., Ivannikov R., Hasterok R., Kunakh V. Assessment of the molecular cytogenetic, morphometric and biochemical parameters of *Deschampsia antarctica* from its southern range limit in maritime Antarctic. *Polish Polar Res.* 2018. Vol. 39, No 4. P. 525–548. doi: 10.24425/118759.
  22. Pastova L., Belyayev A. Mahelka V. Molecular cytogenetic characterisation of *Elytrigia × mucronata*, a natural hybrid of *E. intermedia* and *E. repens* (Triticeae, Poaceae). *BMC Plant Biol.* 2019. Vol. 19, No 230. doi:10.1186/s12870-019-1806-y
  23. 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. No 1. P. 8–15. doi: 10.1007/BF02772108.
  24. 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
  25. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1626 p.
  26. 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.
  27. 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. No 6. P. 3019–3033. doi: 10.1093/nar/gky163.
  28. Turner D. H., Mathews D. H. NNDB: The nearest neighbor parameter database for predicting stability of nucleic acid secondary structure. 2009. *Nucl. Acids Res.* Vol. 38. P. D280-D282. doi: 10.1093/nar/gkp892
  29. Tynkevich Y. O., Volkov R. A. 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol. Genet.* 2019. Vol. 53. No 6. P. 26–35. doi: 10.3103/S0095452719060100
  30. 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/S0095452714010095.
  31. Venkateswarlu K., Lee S. W., Nazar R. N. Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene*. 1991. Vol. 105. P. 249–253. doi: 10.1016/0378-1119(91)90158-8
  32. Volkov R. A., Panchuk I. I. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Вісн. Укр. тов-ва генетики і селекціонерів*. 2014. Т. 12, № 1. С. 3–11.
  33. 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.
  34. Volkov R. A., Panchuk I. I., Borisjuk N. V., Hosiawa-Baranska M., Maluszynska J., Hemleben V. Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* 2017. Vol. 17, No 1. P. 1–15. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6.
  35. Volkov R. A., Zanke C., Panchuk I. I., Hemleben V. Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species

(sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2001. Vol. 103, No 8. P. 1273–1282. doi: 10.1007/s001220100670.

36. Wicke S., Costa A., Munoz J., Quandt D. Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Mol. Phyl. Evol.* 2011. Vol. 61. P. 321–332.
37. Wright J. P., Jones C. G. The concept of organisms as ecosystem engineers ten years on: progress, limitations, and challenges. *BioScience.* 2006. Vol. 56, No 3. P. 203–209. doi:10.1641/0006-3568(2006)056(0203:tcooae)2.0.co;2.

### References

- Panchuk I. I., Volkov R. A. Praktykum z molekuli rnoi henetyky. Chernivtsi: Ruta. 2007. 120 c.
- 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*). *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetiv i selekcioneriv.* 2016. Vol. 14, No 2. P. 216–220.
- Tynkevich Y. O., Volkov R. A. Novel structural class of 5S rDNA of *Rosa wichurana* Crep. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2014. No 5. P. 143–148.
- Tynkevich Y. O., Nevelska A. O., Chorney I. I., Volkov R. A. Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetiv i selekcioneriv.* 2015. Vol. 13, No 1. P. 81–87.
- Shelyfist A. Y., Tynkevich Y. O., Volkov R. A. Molecular organization of 5S rDNA of *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetiv i selekcioneriv.* 2018. Vol. 16, No 1. P. 61–68.
- 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, No 17. P. 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- 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.
- Bolsheva N. L., Melnikova N. V., Kirov I. V., Speranskaya A. S., Krinitsina A. A., Dmitriev A. A., Rozhmina T. A. Evolution of blue-flowered species of genus *Linum* based on high-throughput sequencing of ribosomal RNA genes. *BMC Evol. Biol.* 2017. Vol. 17, No 2. P. 23–36. doi:10.1186/s12862-017-1105-x.
- Cloix C., Yukawa Y., Tutois S., Sugiura M., Tourmente S. In vitro analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant J.* 2003. Vol. 35. P. 251–226. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01793.x
- 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
- de Souza T. B., Gaeta M. L., Martins C., Vanzela A. L. L. IGS sequences in *Cestrum* present AT- and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol. Biol. Reports.* 2019. P. 1–12. doi: 10.1007/s11033-019-05104-y
- 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
- Denk T., Grimm G. W. The oaks of western Eurasia: traditional classifications and evidence from two nuclear markers. *Taxon.* 2010. Vol. 59, No 2, P. 351–366. doi: 10.1002/tax.592002.
- 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
- Fulnecek J., Lim K. Y., Leitch A. R., Kovarik A., Matyásek R. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity.* 2002. Vol. 88. P. 19–25. doi: 10.1038/sj.hdy.6800001
- Hipp A. L., Manos P. S., Hahn M., Avishai M., Bodénès C., Cavender-Bares J., Crawl A., Deng M., Denk T., Fitz-Gibbon S., Gailing O., González-Elizondo M.S., González-Rodríguez A., Grimm G. W., Jiang X.-L., Kremer A., Lesur I., McVay J. D., Plomion C., Rodríguez-Correa H., Schulze E.-D., Simeone M. C., Sork V. L., Valencia-Avalos S. Genomic landscape of the global oak phylogeny. *bioRxiv.* 2019. P. 587253. doi: 10.1101/587253
- Ibiapino A., García M. A., Ferraz M. E., Costea M., Stefanovic S., Guerra M. Allopolyploid origin and genome differentiation of the parasitic species *Cuscuta veatchii* (Convolvulaceae) revealed by genomic in situ hybridization. *Genome.* 2019. Vol. 62, No 7. P. 467–475. doi: 10.1139/gen-2018-0184
- Ishchenko O. O., Panchuk I. I., Andreev I. O., Kunakh V. A., Volkov R. A. Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol. Genet.* 2018. Vol. 52. No 6. P. 416–421. doi: 10.3103/S0095452719010146.
- Layat E., Saez-Vasquez J., Tourmente S. Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2012. Vol. 53, No 2. P. 267–276. doi:10.1093/pcp/pcr177.
- Mlinarec J., Franjevic D., Bockor 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.
- Navrotska D., Andreev I., Betekhtin A., Rojek M., Parnikoza I., Myryuta G., Ivannikov R., Hasterok R., Kunakh V. Assessment of the molecular cytogenetic, morphometric and biochemical parameters of *Deschampsia antarctica* from its southern range limit



- in maritime Antarctic. *Polish Polar Res.* 2018. Vol. 39, No 4. P. 525–548. doi: 10.24425/118759.
22. Pastova L., Belyayev A. Mahelka V. Molecular cytogenetic characterisation of *Elytrigia* × *mucronata*, a natural hybrid of *E. intermedia* and *E. repens* (Triticeae, Poaceae). *BMC Plant Biol.* 2019. Vol. 19, No 230. doi: 10.1186/s12870-019-1806-y
  23. 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. No 1. P. 8–15. doi: 10.1007/BF02772108.
  24. 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
  25. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1626 p.
  26. 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
  27. 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. No 6. P. 3019–3033. doi: 10.1093/nar/gky163.
  28. Turner D. H., Mathews D. H. NNDB: The nearest neighbor parameter database for predicting stability of nucleic acid secondary structure. 2009. *Nucl. Acids Res.* Vol. 38. P. D280–D282. doi: 10.1093/nar/gkp892
  29. Tynkevich Y. O., Volkov R. A. 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol. Genet.* 2019. Vol. 53. No 6. P. 26–35.
  30. 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/S0095452714010095.
  31. Venkateswarlu K., Lee S. W., Nazar R. N. Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene.* 1991. Vol. 105. P. 249–253. doi: 10.1016/0378-1119(91)90158-8
  32. Volkov A. R., Panchuk I. I. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetiki v selekcioneriv.* 2014. Vol. 12, No 1. P. 3–11.
  33. 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.
  34. Volkov R. A., Panchuk I. I., Borisjuk N. V., Hosiawa-Baranska M., Maluszynska J., Hemleben V. Evolutionary dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol.* 2017. Vol. 17, No 1. P. 1–15. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6.
  35. Volkov R. A., Zanke C., Panchuk I. I., Hemleben V. Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 2001. Vol. 103, No 8. P. 1273–1282. doi: 10.1007/s001220100670.
  36. Wicke S., Costa A., Munoz J., Quandt D. Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Mol. Phyl. Evol.* 2011. Vol. 61. P. 321–332.
  37. Wright J. P., Jones C. G. The concept of organisms as ecosystem engineers ten years on: progress, limitations, and challenges. *BioScience.* 2006. Vol. 56, No 3. P. 203–209. doi:10.1641/0006-3568(2006)056(0203:tc00ae)2.0.co;2.

#### ORGANIZATION OF 5S RDNA REPEATED UNIT OF QUERCUS IMBRICARIA MICHX.

A. S. Stratiichuk, T. O. Derevenko, Y. O. Tynkevych

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

**Aim.** The 5S rDNA repeats represent a universal model for the investigation of molecular evolution of repeated sequences. Also, comparison of 5S rDNA was successfully applied for the elucidation of phylogenetic relationships between the closely related plant species. However, there is practically no data regarding the molecular organization of 5S rDNA repeats in members of the section *Lobatae*, one of the largest groups of the genus *Quercus*. Accordingly, our aim was to investigate the 5S rDNA organization for *Q. imbricaria*, a species that belongs to this section. **Methods.** DNA extraction, PCR amplification, cloning and sequencing. **Results.** A complete 5S rDNA repeat of *Q. imbricaria* was cloned and sequenced. It has been found that in the oak genome, the 5S rDNA coding region contains five nucleotide substitutions as compared to that in *Arabidopsis*. Nevertheless, the predicted secondary structure of the transcript retains all typical features of 5S rRNA. Presumptive sequence elements of the external promoter were identified in the IGS. **Conclusions.** The nucleotide substitutions that occur in the 5S rRNA during evolution appear to be compensatory, resulting in conservation of its secondary structure. Due to considerable differences among the species of different sections, the 5S rDNA IGS can be applied for the taxonomic studies in the genus *Quercus*.

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