

МОЛЕКУЛЯРНА БУДОВА 5S рДНК *MANDRAGORA AUTUMNALIS* BERTOL.

А. Є. ШЕЛИФІСТ, Д. В. ЯКОБИШЕН, Р. А. ВОЛКОВ

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

Мета. У всіх еукаріотичних організмів в геномі присутня ділянка, яка кодує 5S рРНК (5S рДНК). 5S рДНК являє собою універсальну модель для вивчення молекулярної еволюції тандемно організованих повторюваних послідовностей. Втім, у родині *Solanaceae* молекулярна організація 5S рДНК досліджена лише для кількох родів. У зв'язку з цим нами було вирішено охарактеризувати будову 5S рДНК *Mandragora autumnalis*, представника триби *Mandragoreae*, яка займає ізольоване положення у родині Пасльонові. **Методи.** ПЛР-ампліфікація, клонування та розшифрування нуклеотидної послідовності. **Результати.** Сиквеновано дві клоновані послідовності 5S рДНК *M. autumnalis*. Встановлено, що в геномі цього виду присутній лише один клас повторів 5S рДНК, які мають міжгенний спейсер (МГС) довжиною 103 нп. Це — найменший розмір МГС, відомий на сьогодні для родини *Solanaceae*. Нуклеотидна послідовність МГС *M. autumnalis* демонструє помірний рівень подібності з МГС інших представників підродини *Solanoideae*. **Висновки.** Отримані результати підтримують існуючі уявлення про ізольоване таксономічне положення роду *Mandragora* в межах підродини *Solanoideae*. Найвищий рівень подібності притаманний ділянкам МГС, які відповідають потенційним зовнішнім елементам промотора та термінатора РНК-полімерази III. Мутації, які виникали у частині МГС перед кодувальною ділянкою, мали компенсаторний характер, що забезпечувало збереження зовнішніх елементів промотора протягом еволюції.

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

Вступ. Ділянки геному, які кодують 5S рРНК (5S рДНК), належать до класу тандемно організованих повторюваних послідовностей, кількість яких на геном коливається від менше за 1000 до більше за 75000 копій (Cloix et al., 2000; Simon et al., 2018; Feng et al., 2018). Кожна повторювана одиниця (повтор) складається з високо консервативної кодувальної ділянки та міжгенного спейсера (МГС), який еволюціонує з високою швидкістю (Barciszewska et al., 2001; Simon et al., 2018). Проте, у МГС наявні відносно консервативні мотиви, які є елементами промотора або термінатора РНК-полімерази III (Volkov et al., 2001; Cloix et al., 2003; Leśniewska, Boguta, 2017; Sergeeva et al., 2017; Simon et al., 2018). Завдяки присутності у геномах всіх організмів, 5S рДНК становить універсальну модель для вивчення молекулярної еволюції тандемно організованих повторюваних послідовностей. Крім того, порівняльний аналіз МГС 5S рДНК з успіхом використовується у таксономічних дослідженнях, зокрема для таксонів низького рангу (Volkov et al., 2001; Saini, Jawali, 2009; Mlinarec et al., 2016; Bolsheva et al., 2017; Simeone et al., 2018; Tynkevich, Volkov, 2019).

Зручним об'єктом для вивчення питань молекулярної еволюції є родина Пасльонові (*Solanaceae*) — одна з найбільших серед покритонасінних рослин (Olmstead et al., 2008; Ganaie et al., 2018; Ranaweera et al., 2018).

Незважаючи на велику увагу дослідників, яку привертає до себе ця економічно важлива родина, 5S рДНК пасльонових все ще залишається вивченою лише для обмеженої кількості родів та видів (Park et al., 2000; Volkov et al., 2001; Davidjuk et al., 2010; Давидюк та ін., 2013; Sun et al., 2014; Volkov et al., 2017; Шелифіст та ін., 2018). Зокрема, нічого невідомо про молекулярну організацію цієї ділянки геному у рослин роду *Mandragora* L. — єдиного представника триби *Mandragoreae*, яка займає ізольоване положення у родині Пасльонові (Olmstead et al., 2008; Tu et al., 2010; Volis et al., 2018). Цей рід представлений лише трьома-п'ятьма видами багаторічних трав, які зустрічаються виключно в Євразії та північній Африці (Volis et al., 2015). У зв'язку з цим метою нашої роботи було проаналізувати молекулярну будову МГС 5S рДНК *Mandragora autumnalis* Bertol.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження був гербарний матеріал *M. autumnalis*, отриманий з Ботанічного саду університету м. Грац, Австрія. Загальну ДНК екстрагували згідно стандартної методики (Porebski et al., 1997).

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). З цією метою використовували пару універсальних праймерів 5S-14а (5'-GCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3') і 5S-15 (5'-GCTTAACCTCGGAGTTCTGATGGGA-3'), комплементарних до ділянки, що кодує 5S рРНК у дводольних рослин (Volkov et al., 2001). Застосування цих праймерів забезпечує ампліфікацію повного МГС та фланкувальних ділянок кодувальної послідовності за винятком 8 нп у її центральній частині. Реакційна суміш загальним об'ємом 10 мкл містила наступні компоненти: 4–12 нг ДНК, 2 мкл буферу 5^x HOT FIREPol® Blend Master Mix, а також по 0,12 мкМ кожного з праймерів. ПЛР проводили з використанням ампліфікатора MiniCycler (MJ Research Inc, США) за програмою: (1) початкова денатурація ДНК — 95 °С, 13 хв; (2) денатурація ДНК — 95 °С, 15 с; (3) гібридизація праймерів — 60 °С, 20 с; (4) синтез ДНК — 72 °С, 30 с; (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 (Sambrook et al., 1989).

Отримані фрагменти ДНК лігували у плазмідний вектор рJET1.2 з використанням набору CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL-blue продуктами лігування проводили методом електропорації з використанням приладу *E. coli* Pulser (BioRad, США). Бактерії, які містили рекомбінантні плазміди, виявляли за здатністю утворювати колонії у присутності ампіциліну (100 мг/л). Плазміди виділяли методом лужного лізису (Sambrook et al., 1989).

Наявність вставки у плазмідах перевіряли, застосовуючи ПЛР із праймерами рJET1.2 Forward (For) та рJET1.2 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 програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Clustal W (Thompson et al., 1994), а пошук гомологічних послідовностей у Genbank — з використанням програми BLAST (Altschul et al., 1997).

Результати та обговорення

Електрофоретичний аналіз ампліфікатів повторюваної одиниці 5S рДНК показав, що в результаті ПЛР утворюються лише фрагменти довжиною близько 230 нп, що вказує на наявність у геномі *M. autumnalis* тільки одного варіанту 5S рДНК. Отримані ПЛР-продукти лігували у плазмідний вектор рJET1.2 та трансформували у клітини *E. coli*. Після перевірки на наявність вставки два з отриманих рекомбінантних клонів було відібрано для подальшого сиквенування.

Отримані полінуклеотидні послідовності було порівняно з наявними у Genbank послідовностями 5S рДНК представників найбільш таксономічно близьких родів, які мають базове хромосомне число $x = 12$ і належать підродини Solanoideae (Olmsted et al., 2008; Ganaie et al., 2018). Також для порівняння було використано 5S рДНК віддалено спорідненого виду *Brunfelsia uniflora* ($x = 11$ (Olmsted et al., 2008)) (табл. 1, рис. 1, 2). У результаті проведеного комп'ютерного аналізу було з'ясовано, що розмір МГС 5S рДНК у *M. autumnalis* становить 103 нп: це найменший розмір МГС серед досліджених на сьогодні представників родини Solanaceae

Молекулярна будова 5S рДНК *Mandragora autumnalis* Bertol.

(табл. 1). Між двома просиквенованими клонами у МГС було виявлено мінімальні відмінності — одна трансверсія (Т→G у положенні 75) та одна транзиція (Т→С у положенні 91). Було

також встановлено, що для *M. autumnalis* притаманний найнижчий порівняно з іншими видами родини Solanaceae вміст GC-пар у МГС — 26,2 %.

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

Назва виду	Назва клону	GenBank Acc. No	Довжина МГС, нп	Вміст GC-пар, %	Посилання
<i>Mandragora autumnalis</i>	Maaut2	---	103	26,2	Ця стаття
	Maaut3	---	103	26,2	
<i>Atropa belladonna</i>	Atbel5	KY126362	138	34,1	Volkov et al., 2017
<i>Solanum okadae</i>	Sooka5	AJ226066	220	49,1	Volkov et al., 2001
<i>Solanum bulbocastanum</i>	Sobul2	AJ226012	189	50,7	Volkov et al., 2001
<i>Solanum circaeifolium</i>	Socir3	AJ226018	229	50,2	Volkov et al., 2001
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc	X55697	235	46,0	Lee, Nazar, 1990, unpublished
<i>Solanum melongena</i>	Somel1	HM042870	198	49,0	Davidjuk et al., 2010
<i>Capsicum baccatum</i>	Cabac	AF217951	180	47,8	Park et al., 2000
<i>Lycianthes rantonnei</i>	Lyrar3	MK638984	183	53,6	Grabiele et al., 2019, unpublished
<i>Datura metel</i>	Damet	AY334494	231	52,0	Tsim et al., 2003, unpublished
<i>Brunfelsia uniflora</i>	Bfuni21	MH277105	223	35,0	Шелифіст та ін., 2018

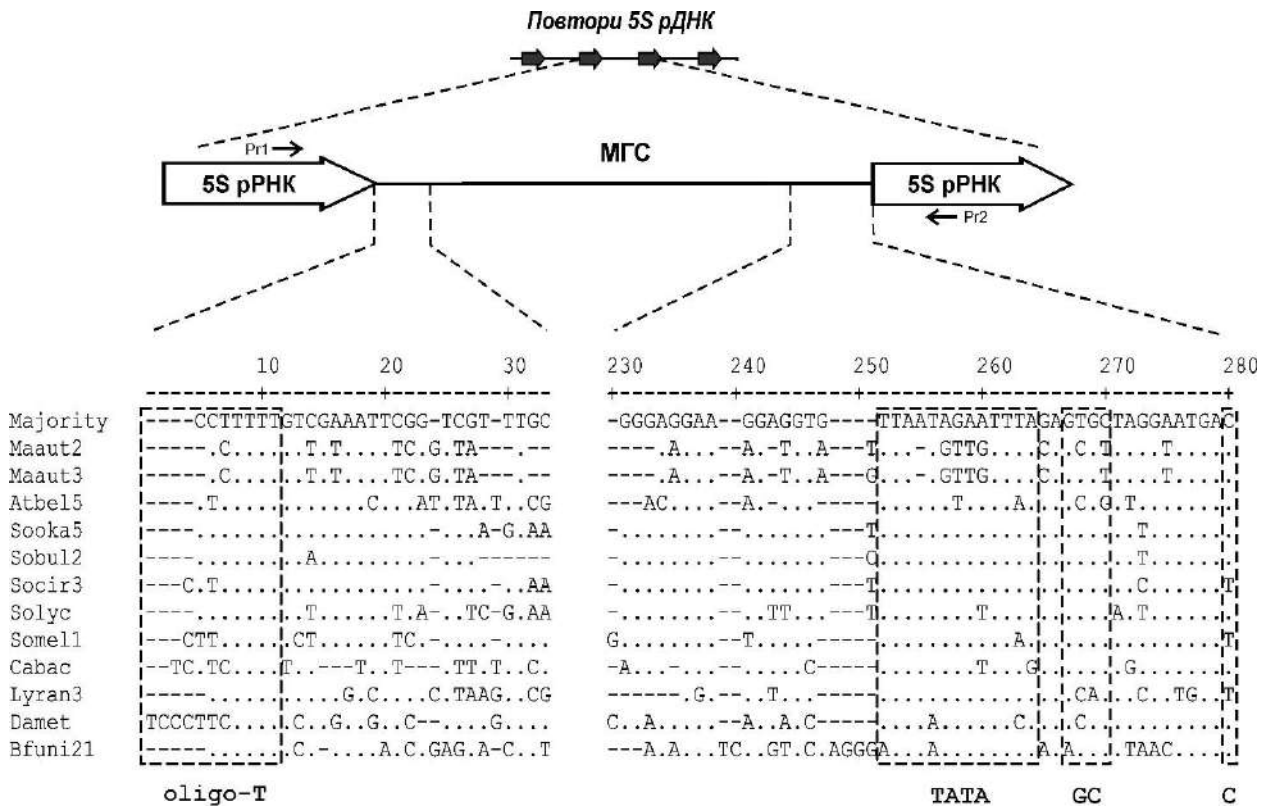


Рис 1. Структурна організація початкової та кінцевої ділянок МГС 5S рДНК видів родини Solanaceae. Pr1 та Pr2 — праймери 5S-14a та 5S-15 відповідно. Вказано розташування оліго-Т послідовності термінатора та передбачуваних зовнішніх елементів промотора РНК-полімерази III. Характеристики клонів наведено у табл. 1.

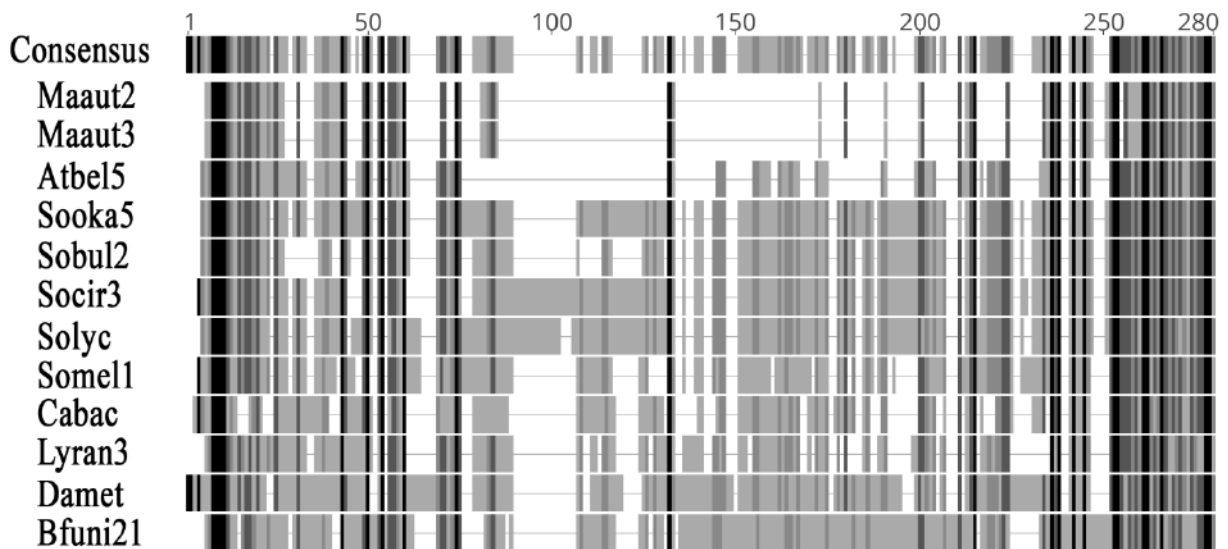


Рис 2. Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей МГС 5S рДНК *M. autumnalis* та деяких представників родини Solanaceae. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1. Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: □ — менше 60 %, ▒ — 60–80 %, ▓ — 80–100 %, ■ — 100 %.

Молекулярна будова 5S рДНК *Mandragora autumnalis* Bertol.

Рівень подібності між МГС *M. autumnalis* та іншими представниками підродини Solanoideae знаходиться у межах від 71,6 до 60,6 %, тоді як при порівнянні із *Brunfelsia uniflora* цей показник знижується до 57,6–59,6 % (табл. 2). Такі ре-

зультати цілком узгоджуються з уявленнями про ізольоване таксономічне положення роду *Mandragora* у підродині Solanoideae (Olmstead et al., 2008; Volis et al., 2018).

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

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	№ з/п	Назва клону
100	98,1	71,6	70,6	70,4	67,6	71,6	66,3	68,1	61,6	65,3	57,6	1	Maaut2
	100	70,5	70,6	71,4	67,6	71,6	67,3	69,2	60,6	64,3	59,6	2	Maaut3
		100	67,4	71,2	72,7	66,7	63,4	64,2	66,7	64,2	51,9	3	Atbel5
			100	91,0	90,5	81,1	72,1	60,3	67,6	67,8	53,3	4	Sooka5
				100	89,8	79,8	75,0	63,7	72,8	70,2	55,6	5	Sobul2
					100	78,6	75,3	63,2	72,0	70,1	50,5	6	Socir3
						100	66,8	60,1	65,2	63,1	49,7	7	Solyc
							100	63,4	66,5	67,7	50,6	8	Somel1
								100	61,9	56,8	47,0	9	Cabac
									100	65,2	51,1	10	Lyran3
										100	53,5	11	Damet
											100	12	Bfuni21

Примітка. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1.

Загальновідомо, що транскрипцію генів 5S рРНК забезпечує РНК-полімераза III. При цьому для ініціації транскрипції необхідні як внутрішні елементи промотора, які розташовані у кодувальній ділянці, так і зовнішні елементи, присутні у МГС перед кодувальною ділянкою (Douet, Tourmente, 2007; Layat et al., 2012; Leśniewska, Voguta, 2017). З огляду на участь в ініціації транскрипції, варто очікувати, що зовнішні елементи промотора мають бути порівняно консервативними, як це було дійсно встановлено для кількох груп рослин, у тому числі — і для представників родини Solanaceae (Volkov et al., 2001; Davidjuk et al., 2010; Sun et al., 2014; Шелифіст та ін., 2018). Наші нові дані також підтримують такі уявлення, оскільки саме частина МГС перед кодувальною ділянкою демонструє підвищений рівень подібності (див. рис. 2).

В *Arabidopsis thaliana*, зовнішні елементи промотора представлені трьома мотивами, серед яких так званий ТАТА-бокс — шестинуклеотидна послідовність, наявна у позиції -28 нп від 5'-кінця кодувальної ділянки 5S рРНК (Douet, Tourmente, 2007). Порівняння послідовностей МГС показує, що у представників родини Solanaceae потенційний ТАТА-бокс локалізований у позиції -29, а його послідовність у більшості видів має вигляд ТТААТА (див. рис. 1). Проте, у *M. autumnalis* ця ділянка дещо відрізняється і має вигляд ТТАТGT. Водночас, звертає на себе увагу, що наступні шість нуклеотидів — як у *M. autumnalis*, так і в інших представників Solanaceae — переважно представлені залишками аденіну та тиміну. Отже, у всіх Solanaceae у МГС в положенні -28–29 нп присутня відносно консервативна АТ-збагачена ділянка розміром

12–13 нп, до складу якої у деяких видів входять лише 1–2 залишки гуаніну (див. рис. 1). Можна припустити, що ця АТ-збагачена ділянка функціонально відповідає ТАТА-боксу *A. thaliana*.

Іншими зовнішніми елементами промотора РНК-полімерази III, які було виявлено у *A. thaliana*, є GC-динуклеотид у положенні -12 від 5'-кінця кодувальної ділянки та залишок цитозину у положенні -1 (Douet, Tourmente, 2007). У такому ж положенні зустрічається GC-динуклеотид і в більшості досліджених видів Solanaceae (див. рис. 1). Проте, у трьох видів, *M. autumnalis*, *Atropa belladonna* та *Lycianthes rantonnei*, GC-динуклеотид в положенні -12 відсутній внаслідок заміни нуклеотидів. Але, у *A. belladonna*, *L. rantonnei* та одного з двох досліджених клонів *M. autumnalis* як результат ще однієї нуклеотидної заміни виникає GC-динуклеотид в положенні -14. Відповідно, можна припустити, що ця друга мутація компенсує втрату GC-динуклеотиду в положенні -12.

З представлених на рис. 1 даних видно, що у положенні -1 від 5'-кінця кодувальної ділянки в представників родини Solanaceae переважає цитозин, який у трьох видів замінений на тимін. Зазначимо, що залишок тиміну у положенні -1 зустрічається також у представників родин Fabaceae (Тункевич, Volkov, 2019), тоді як у Fabaceae, Rosaceae, Sapindaceae та Poaceae тут присутній залишок цитозину (Тункевич, Volkov, 2014; Volkov, Panchuk, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Русак та ін., 2016; Ishchenko et al., 2018). Отже, складається враження, що для роботи РНК-полімерази III важлива наявність у цій позиції піримідинової основи.

Згідно отриманим даним, найбільш консервативним мотивом у МГС в районі 5'-кінця кодувальної ділянки є димер GA у положенні -3, що може свідчити про його важливість для функціонування РНК-полімерази III.

Зона термінації транскрипції локалізована на початку МГС (Cloix et al., 2003). Як видно з рис. 1, це — Т-багата ділянка, розміри якої у порівнюваних видів можуть суттєво відрізнятися. Спільним для всіх досліджуваних представників Solanaceae є консервативний мотив TTTT.

Висновки

Геном *M. autumnalis* містить лише один клас повторів 5S рДНК, які мають МГС довжиною 103 нп. Нуклеотидна послідовність МГС *M. autumnalis* демонструє помірний рівень подібності (61–72 %) з МГС інших представників підродини Solanoideae. Такі результати підтри-

мують існуючі уявлення про ізольоване таксономічне положення роду *Mandragora*. Найвищий рівень подібності притаманний ділянкам МГС, які відповідають потенційним зовнішнім елементам промотора та термінатора РНК-полімерази III. Мутації, які виникали у частині МГС перед кодувальною ділянкою, мали компенсаторний характер, що забезпечувало збереження зовнішніх елементів промотора.

Перелік літератури

1. Давидюк Ю. М., Молода О. О., Волков Р. А. Молекулярна організація 5S рДНК *Solanum betaceum* Sav. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2013. Т. 11. № 1. С. 14–19.
2. Русак О. О., Петрашук В. І., Панчук І. І., Волков Р. А. Молекулярна організація 5S рДНК двох українських популяцій явора (*Acer pseudoplatanus*). Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2016. Т. 14. № 2. С. 216–220.
3. Тинкевич Ю. О., Невельська А. О., Чорней І. І., Волков Р. А. Організація та мінливість міжгенного спейсера 5S рДНК *Lathyrus venetus*. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2015. Т. 13. № 1. С. 81–87.
4. 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. Т. 16. № 1. С. 61–68.
5. Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer 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.
6. Barciszewska M. Z., Szymański M., Erdmann V. A., Barciszewski J. Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim. Polon.* 2001. Vol. 48. No 1. P. 191–198.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Davidjuk Y. M., Hemleben V., Volkov R. A. Structural organization of 5S rDNA of eggplant, *Solanum melongena* L. *Біологічні системи.* 2010. Т. 2. № 1. С. 3–6.
11. 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.
12. Feng S., Zhu Y., Yu C., Jiao K., Jiang M., Lu J., Shen C., Ying Q., Wang H. Development of species-specific SCAR markers, based on a SCoT analysis, to authenticate *Physalis* (Solanaceae) species. *Frontiers in Genetics*. 2018. Vol. 9. Article 192. doi: 10.3389/fgene.2018.00192.
 13. Ganaie M., Raja V., Reshi Z. A., Verma V. Family Solanaceae: Taxonomy and modern trends. *Ann. Plant Sci.* 2018. Vol. 7. No 9. P. 2403–2414. doi: 10.21746/aps.2018.7.9.1.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Leśniewska E., Boguta M. Novel layers of RNA polymerase III control affecting tRNA gene transcription in eukaryotes. *Open Biol.* 2017. Vol. 7. No 2. doi: 10.1098/rsob.170001.
 17. 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.
 18. Olmstead R. G., Bohs L., Migid H. A., Santiago-Valentin E., Garcia V. F., Collier S. M. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*. 2008. Vol. 57. No 4. P. 1159–1181. doi: 10.1002/tax.574010.
 19. 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. doi: 10.1007/s10059-000-0018-4.
 20. 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.
 21. Ranaweera L. T., Hancock J. F., Weebadde C. K., Sooriyapathirana S. D. S. Phylogeographic and phylogenetic analyses of selected set of wild and naturalized *Solanum* spp. in Sri Lanka. *Ceylon J. Sci.* 2018. Vol. 47. No 1. P. 85–93. doi: 10.4038/cjs.v47i1.7491.
 22. 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.
 23. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1626 p.
 24. Sergeeva E. M., Shcherban A. B., Adonina I. G., Nesterov M. A., Beletsky A. V., Rakitin A. L., Mardanov A. V., Ravin N. V., Salina E. A. Fine organization of genomic regions tagged to the 5S rDNA locus of the bread wheat 5B chromosome. *BMC Plant Biol.* 2017. Vol. 17: 183. P. 144–155. doi: 10.1186/s12870-017-1120-5.
 25. Simeone M. C., Cardoni S., Piredda R., Imperatori F., Avishai M., Grimm G. W., Denk T. Comparative systematics and phylogeography of *Quercus section Ceris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation. *Peer J.* 2018. doi: 10.7717/peerj.5793.
 26. 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.
 27. Sun Y. L., Kang H. M., Kim Y. S., Baek J. P., Zheng S. L., Xiang J. J., Hong S. K. Tomato (*Solanum lycopersicum*) variety discrimination and hybridization analysis based on the 5S rRNA region. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2014. Vol. 28. No. 3. P. 431–437. doi: 10.1080/13102818.2014.928499.
 28. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 1994. Vol. 22. No 22. P. 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
 29. Tu T., Volis S., Dillon M. O., Sun H., Wen J. Dispersals of Hyoscyameae and Mandragoreae (Solanaceae) from the New World to Eurasia in the early Miocene and their biogeographic diversification within Eurasia. *Mol. Phylogen. Evol.* 2010. Vol. 57. P. 1226–1237. doi: 10.1016/j.ympev.2010.09.007.
 30. 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.
 31. 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.
 32. Volis S., Fogel K., Tu T., Sun H., Zaretsky M. Evolutionary history and biogeography of *Mandragora* L. (Solanaceae). *Mol. Phylogen. Evol.* 2018. Vol. 129. P. 85–95. doi: 10.1016/j.ympev.2018.08.015.
 33. Volis S., Tu T., Deng T., Zaretsky M., Fogel K., Sun H. Phylogeographic study of *Mandragora* L. reveals a case of ancient human assisted migration. *Israel J. Plant Sci.* 2015. Vol. 62. No. 3. 176–186. doi: 10.1080/07929978.2015.1063922.
 34. 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.
 35. 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 Biology*. 2017. Vol. 17: 21. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6.

36. Volkov R. A., Zanke C., Panchuk I. I., Hembleben 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.

References

- Davidjuk Y. M., Moloda O. O., Volkov R. A. Molecular organization of 5S rDNA of *Solanum betaceum* Cav. *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetikiv i selekcioneriv.* 2013. Vol. 11. No 1. P. 14–19.
- Rusak O. O., Petrashchuk V. I., Panchuk I. I., Volkov R. A. Molecular organization of 5S rDNA in two Ukrainian populations of sycamore (*Acer pseudo-platanus*). *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetikiv i selekcioneriv.* 2016. Vol. 14. No. 2. P. 216–220. doi: 10.7124/visnyk.utgis.14.2.691.
- 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 genetikiv 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 genetikiv i selekcioneriv.* 2018. Vol. 16, No 1. P. 61–68. doi: 10.7124/visnyk.utgis.16.1.903.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer 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. No 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., 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.
- 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.
- Davidjuk Y. M., Hembleben V., Volkov R. A. Structural organization of 5S rDNA of eggplant, *Solanum melongena* L. *Biol. Systems.* 2010. Vol. 2. No 1. P. 3–6.
- 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.
- Feng S., Zhu Y., Yu C., Jiao K., Jiang M., Lu J., Shen C., Ying Q., Wang H. Development of species-specific SCAR markers, based on a SCoT analysis, to

- authenticate *Physalis* (Solanaceae) species. *Frontiers in Genetics.* 2018. Vol. 9. Article 192. doi: 10.3389/fgene.2018.00192.
- Ganaie M., Raja V., Reshi Z. A., Verma V. Family Solanaceae: Taxonomy and modern trends. *Ann. Plant Sci.* 2018. Vol. 7. No 9. P. 2403–2414. doi: 10.21746/aps.2018.7.9.1.
 - 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., 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.
 - Leśniewska E., Boguta M. Novel layers of RNA polymerase III control affecting tRNA gene transcription in eukaryotes. *Open Biol.* 2017. Vol. 7. No 2. doi: 10.1098/rsob.170001.
 - 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.
 - Olmstead R. G., Bohs L., Migid H. A., Santiago-Valentin E., Garcia V. F., Collier S. M. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon.* 2008. Vol. 57. No 4. P. 1159–1181. doi: 10.1002/tax.574010.
 - 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. doi: 10.1007/s10059-000-0018-4.
 - 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.
 - Ranaweera L. T., Hancock J. F., Weebadde C. K., Sooriyapathirana S. D. S. S. Phylogeographic and phylogenetic analyses of selected set of wild and naturalized *Solanum* spp. in Sri Lanka *Ceylon J. Sci.* 2018. Vol. 47. No 1. P. 85–93. doi: 10.4038/cjs.v47i1.7491.
 - 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.
 - Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1262 p.
 - Sergeeva E. M., Shcherban A. B., Adonina I. G., Nesterov M. A., Beletsky A. V., Rakitin A. L., Mardanov A. V., Ravin N. V., Salina E. A. Fine organization of genomic regions tagged to the 5S rDNA locus of the bread wheat 5B chromosome. *BMC Plant Biol.* 2017. Vol. 17. P. 144–155. doi: 10.1186/s12870-017-1120-5.

25. 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. doi: 10.7717/peerj.5793.
26. 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.
27. Sun Y. L., Kang H. M., Kim Y. S., Baek J. P., Zheng S. L., Xiang J. J., Hong S. K. Tomato (*Solanum lycopersicum*) variety discrimination and hybridization analysis based on the 5S rRNA region. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2014. Vol. 28. No. 3. P. 431–437. doi: 10.1080/13102818.2014.928499.
28. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 1994. Vol. 22. No 22. P. 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
29. Tu T., Volis S., Dillon M. O., Sun H., Wen J. Dispersals of Hyoscyameae and Mandragoreae (Solanaceae) from the New World to Eurasia in the early Miocene and their biogeographic diversification within Eurasia. *Mol. Phylogen. Evol.* 2010. Vol. 57. P. 1226–1237. doi: 10.1016/j.ympev.2010.09.007.
30. 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/S0095-452719060100.
31. 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/S0095-452714010095.
32. Volis S., Fogel K., Tu T., Sun H., Zaretsky M. Evolutionary history and biogeography of *Mandragora* L. (Solanaceae). *Mol. Phylogen. Evol.* 2018. Vol. 129. P. 85–95. doi: 10.1016/j.ympev.2018.08.015.
33. Volis S., Tu T., Deng T., Zaretsky M., Fogel K., Sun H. Phylogeographic study of *Mandragora* L. reveals a case of ancient human assisted migration. *Israel J. Plant Sci.* 2015. Vol. 62. No. 3, 176–186. doi: 10.1080/07929978.2015.1063922.
34. Volkov A. R., Panchuk I. I. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Visnik ukrains'kogo tovaristva genetikiv i selekcioneriv.* 2014. Vol. 12. No 1. P. 3–11.
35. 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 Biology.* 2017. Vol. 17: 21. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6.
36. 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.

MOLECULAR STRUCTURE OF 5S rDNA OF MANDRAGORA AUTUMNALIS BERTOL.

A. Y. Shelyfist, D. V. Yakobysheva, R. A. Volkov

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

Aim. The region encoding 5S rRNA (5S rDNA) is present in the genome of all eukaryotic organisms. The 5S rDNA represents a universal model for studying the molecular evolution of the tandemly arranged repeated sequences. However, in the family Solanaceae, the molecular organization of 5S rDNA has been investigated only for few genera. In this regard, we decided to characterize the molecular structure of the 5S rDNA of *Mandragora autumnalis*, a representative of the Mandragoreae tribe, which occupies an isolated position in the nightshade family. **Methods.** PCR amplification, cloning and sequencing. **Results.** Two 5S rDNA clones of *M. autumnalis* were sequenced. It was found that in the genome of this species only one class of the 5S rDNA repeats possessing the 103 bp-long intergenic spacer (IGS) is present. This is the smallest size of IGS known to date for the Solanaceae family. The 5S rDNA IGS of *M. autumnalis* demonstrates a moderate level of sequence-similarity with the IGS of other representatives of the subfamily Solanoideae. **Conclusions.** The results support the current opinion about the isolated taxonomic position of the genus *Mandragora* within the subfamily Solanoideae. The increased level of similarity was found in the IGS regions, which contain potential external elements of the RNA polymerase III promoter and terminator. The mutations occurred in the part of the IGS up-stream of the coding region had a compensatory nature, which ensured that the external elements of the promoter were preserved during the evolution.

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