

МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ МІЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА 5S рДНК *GENTIANA PNEUMONANTHE* L. І *G. PUNCTATA* L.

В. М. МЕЛЬНИК^{1,2}, І. О. АНДРЕЄВ¹, Г. Ю. МИРЮТА¹, А. Є. ШЕЛИФІСТ²,
Р. А. ВОЛКОВ², В. А. КУНАХ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

² Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2

Мета. Метою роботи було клонування і аналіз молекулярної організації міжгенного спейсера (МГС) 5S рДНК двох видів роду *Gentiana* флори України, а саме *G. pneumonanthe* L. і *G. punctata* L. **Методи.** Послідовність МГС 5S рДНК ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням пари праймерів, специфічних до кодувальної ділянки гена. Отримані ПЛР-продукти фракціонували гель-електрофорезом, очищали, лігували в плазмідну рUC18, клонували в *E. coli* та секвенували. Нуклеотидні послідовності вирівнювали із використанням алгоритму Muscle та аналізували у програмі Uipro UGENE. **Результати.** Клоновано та визначено нуклеотидну послідовність ділянки міжгенного спейсера генів 5S рРНК двох видів роду *Gentiana* флори України *G. pneumonanthe* і *G. punctata*. На основі вирівнювання послідовностей п'яти видів роду з трьох секцій встановлено деякі особливості молекулярної організації МГС генів 5S рРНК у вивчених представників роду. Показано наявність типових для інших родів покритонасінних рослин мотивів, а саме — консервативного оліго-dT мотиву на початку МГС, який відіграє роль ділянки термінації транскрипції, та АТ-багатої ділянки, що передуює кодувальному регіону гена 5S рРНК, водночас в ділянці ініціації транскрипції замість консервативного GC елемента в положенні –13 знаходиться AC. **Висновки.** Встановлено міжвидову мінливість молекулярної організації МГС *Gentiana*, що може бути використано для уточнення філогенетичних відносин між представниками цього роду.

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

Вступ. Тирлич (*Gentiana* L.) — найбільший рід родини *Gentianaceae* Juss., який налічує за різними даними близько 360–400 видів (Tutin, 1972; Ho, Liu, 1990). Обсяг і класифікація роду до цього часу є предметом дискусій, що пояснюється як наявністю агрегатних видів у межах роду, так і складністю визначення родових меж, зумовленою особливостями еволюції тирличевих, які утворюють численні паралельні ряди конвергентних форм (Ho, Liu, 1990; Ho et al., 1996; Struwe et al., 2002). Види цього роду є типовими альпійськими рослинами і трапляються переважно на висоті понад 1000 м над р.м., проте деякі — виключно на рівнинах (Struwe et al., 2002; Страшнюк та ін., 2005). На сьогодні існує кілька класифікацій роду, в основу яких покладено морфологічні, анатомічні, еколого-географічні, хемо- і цитотаксономічні, генетичні, тощо, ознаки (критерії) (Tutin, 1972; Ho, Liu, 1990; Ho et al., 1996; Jensen, Schripsema, 2002; Mel'nyk et al., 2014). Останнім часом дедалі більшої популярності для філогенетичних досліджень *Gentiana* набувають молекулярно-генетичні підходи (Hungerer, Kadereit, 1998; Hammerli, 2007; Favre et al., 2010, 2014; Мельник, 2013; Kunakh et al., 2015). Зокрема широкого використання набули деякі послідовності хлоропластного геному та ділянки внутрішніх транскрибованих спейсерів ядерної 35S рибосомної ДНК (Gielly, Taberlet, 1994; Gielly et al., 1996; Yuan et al., 1996; Yuan, Kupfer, 1997). Проте, дані таких досліджень можуть давати суперечливі результати, що обумовлено різною швидкістю еволюції різних ділянок геному.

Популярним молекулярно-генетичним маркером, який з успіхом використовується для з'ясування філогенетичних відносин між таксонами низького рангу у рослин, є міжгенний спейсер (МГС) ядерної 5S рДНК (Volkov, Panchuk, 2014; Тинкевич та ін., 2015, 2020; Ishchenko et al., 2021). Використання цього маркера дозволило отримати цікаві дані щодо філогенії окремих таксонів роду *Gentiana* (Hammerli, 2007; Wong et al., 2013; Андреев та ін., 2017). На жаль, нуклеотидна послідовність МГС 5S рДНК наразі досліджена лише у деяких видів п'яти секцій (*Gentiana*, *Calathianae*, *Ciminalis*, *Monopodiae* і *Pneumonanthe*) (Hammerli, 2007; Wong et al., 2013; Андреев та ін., 2017).

Метою цієї роботи було клонування і дослідження молекулярної організації МГС 5S рДНК двох видів роду *Gentiana* флори України, а саме *G. pneumonanthe* L. і *G. punctata* L.

Матеріали і методи

Зразки *G. pneumonanthe* і *G. punctata* були взяті з природних місць зростання в Україні: Корюківське лісництво, Чернігівська обл. і гора Брескул, хребет Чорногора, Українські Карпати, відповідно.

ДНК виділяли з листків за методикою з використанням ЦТАБ-буферу (Rogers, Bendich, 1985).

Послідовність МГС 5S рДНК ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням пари праймерів, специфічних до кодувальної ділянки гена, р5S1 (5' — TCA AGC TTG GGT GAC CTC CCG GGA AGT CC — 3') і р5S2 (5' — СТА AGC ТТА АСТ GCG GAG TTC TGA TGG G — 3').

ПЛР проводили в термоциклері Терцик МС2 («Біотехнологія», Росія). Реакційна суміш для проведення реакції об'ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ dNTP, 1,25 од. Таq-полімерази, по 0,25 мкМ кожного з праймерів, 1 × ПЛР-буфер з 1,5 мМ MgCl₂. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію проводили в наступному режимі: 1 цикл 95 °С — 3 хв; 5 циклів (95 °С — 30 с, 54 °С — 30 с, 72 °С — 1 хв); 30 циклів (94 °С — 20 с, 55 °С — 20 с, 72 °С — 40 с); 1 цикл 72 °С — 5 хв.

Отримані ПЛР-продукти розділяли за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, вирізували та очищали від агарози з використанням набору реагентів Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («MBI Fermentas», Литва). Виділені фрагменти ДНК піс-

ля гідролізу ендонуклеазою рестрикції HindIII лігували в плазмідну рUC18. Отримані плазмідні конструкції клонували в *E. coli*. Визначення послідовності клонуваних фрагментів ДНК проводили із використанням зворотнього M13-праймера в фірмі GATC-Biotech (Нідерланди).

Вирівнювання отриманих послідовностей проводили з використанням алгоритму MUSCLE (Edgar, 2004) за допомогою веб-додатку на сервері EMBL-EBI (Madeira et al., 2019) з подальшим уточненням вручну і аналізом у програмі Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Парні дистанції (p-distance) між нуклеотидними послідовностями розраховували в програмі MEGA-X (Kumar et al., 2018).

Результати та обговорення

Матеріалом для дослідження слугували рослини двох видів тирличів *G. pneumonanthe* і *G. punctata*, які відносяться до різних секцій (*Pneumonanthe* і *Gentiana*) та відрізняються за еколого-географічними умовами зростання, ботаничними, генетичними характеристиками, тощо. Електрофоретичне розділення ПЛР-продуктів показало, що розмір ампліконів, які містять МГС 5S рДНК, фланкований невеликими консервативними ділянками кодувальної частини гена, у досліджених видів роду *Gentiana* L. становить близько 450–500 п.н. Як видно з рис. 1, спектри ПЛР-продуктів індивідуальних рослин містять по одному головному фрагменту, що свідчить про гомогенність за довжиною наявних у геномі цих видів варіантів МГС 5S рДНК.

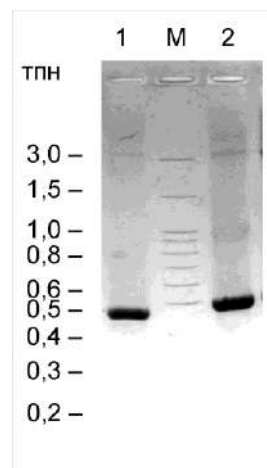


Рис. 1. Електрофоретичне фракціонування продуктів ампліфікації МГС 5S рДНК у двох видів тирличів: 1 — *G. pneumonanthe*; 2 — *G. punctata*; М — молекулярний маркер.

Після клонування отриманих фрагментів і наступної селекції отриманих клонів, для сиквенування було відібрано два клони МГС 5S рДНК *G. pneumonanthe* та один клон *G. punctata*.

Результати сиквенування показали, що довжина клонованої послідовності *G. punctata* становила 400 п.н. Два клони *G. pneumonanthe* мали однакову довжину, яка становила 371 п.н. Порівняння нуклеотидних послідовностей цих клонів між собою дозволило встановити відмінності на рівні 4,3 % (16 нуклеотидів). Майже половину цих варіацій (7) становили заміни G → A, чверть з них (4) припадала на заміни T → C.

Порівняльний аналіз довжини отриманих клонів *G. pneumonanthe* і *G. punctata* із клонованими раніше послідовностями МГС 5S рДНК для інших видів роду *Gentiana* флори України, а саме *G. lutea*, *G. asclepiadea* та *G. acaulis* (Андреев та ін., 2017), показав, що найменша довжина цієї ділянки геному характерна для *G. pneumonanthe* (371 п.н.), найбільша — для *G. acaulis* (500 п.н.) (табл. 1). Для видів *G. punctata* і *G. lutea* різниця у довжині клонів становила 1 нуклеотид (400 і 399 п.н., відповідно). Загалом, для чотирьох з п'яти досліджених видів довжина МГС 5S рДНК була близькою до 400 п.н. (табл. 1).

Таблиця 1. Довжина послідовності МГС гена 5S рДНК деяких видів *Gentiana*

Секція	Вид	Довжина МГС 5S рДНК, п.н.
<i>Pneumonanthe</i>	<i>G. pneumonanthe</i>	371
***	<i>G. asclepiadea</i> *	408
<i>Gentiana</i>	<i>G. punctata</i>	400
	<i>G. lutea</i> *	399
<i>Ciminalis</i>	<i>G. acaulis</i> *	500

Примітка. * за Андреев та ін., 2017; *** — приналежність *G. asclepiadea* до однієї з наведених секцій роду (*Pneumonanthe*) має суперечливий характер і не визначена остаточно.

Вирівнювання та порівняльний аналіз клонованих послідовностей МГС 5S рДНК п'яти видів роду *Gentiana* флори України (табл. 1), проведені у програмі Unipro UGENE з використанням алгоритму Muscle, дозволили виявити деякі особливості молекулярної організації цієї ділянки геному (рис. 2). Зокрема, МГС 5S рДНК досліджених представників роду *Gentiana*, як і в інших видів, містить на початку консервативний оліго-dT мотив, який відіграє роль ділянки термінації транскрипції. Також у МГС видів *Gentiana* виявлено в положенні –30 п.н. АТ-багату ділянку (ТАТА-бокс), що передуює кодувальному регіону гена 5S рДНК. Раніше для модельної рослини *Arabidopsis thaliana* було доведено, що ця ділянка є сайтом ініціації транскрипції (Douet, Tourmente, 2007; Layat et al., 2012). Пізніше подібні АТ-багаті ділянки було знайдено і в представників кількох інших родин покритонасінних рослин (Volkov, Ranshuk, 2014; Тинкевич та ін., 2014, 2015, 2020; Іщенко та ін., 2019; Шелифіст та ін., 2019). Водночас, консервативний 5'-кінець МГС відрізняється від *A. thaliana* та інших видів деяких родин покритонасінних рослин модифікацією іншого консервативного елемента, який вважається необхідним для ініціації транскрипції (Douet, Tourmente, 2007). А саме, у

досліджених видів *Gentiana* в позиції –13 п.н. замість GC знаходиться динуклеотид AC, оточений АТ-багатою послідовністю, розташованою за ТАТА-боксом.

Головні відмінності між дослідженими видами *Gentiana* пов'язані з центральною частиною МГС між цими консервативними ділянками. В усіх видів, за виключенням *G. pneumonanthe*, за полі(Т) послідовністю, що входить до складу сайту термінації, розташована протяжна інсерція (Ins 1, рис. 2) довжиною від 202 п.н. у *G. lutea* до 309 п.н. у *G. acaulis*, яка містить на початку АТ-багату, а наприкінці GC-багату ділянку. Причому така будова МГС характерна не лише для двох видів секції *Gentiana*, але й для виду *G. asclepiadea*, який разом із *G. pneumonanthe* віднесено до секції *Pneumonanthe*. Інсерція 1 має подібну послідовність у цих чотирьох видів і лише у *G. acaulis* відрізняється наявністю додаткової інсерції на початку. За інсерцією 1 розташована ділянка, яка має досить високу подібність у всіх видів за виключенням *G. pneumonanthe*, у якого вона переривається двома інсерціями (Ins 2 та Ins 3, рис. 2): Т-багатою ділянкою довжиною 19 п.н. (позиції 363–381) та АТ-багатою ділянкою довжиною 127 п.н. (позиції 434–560).

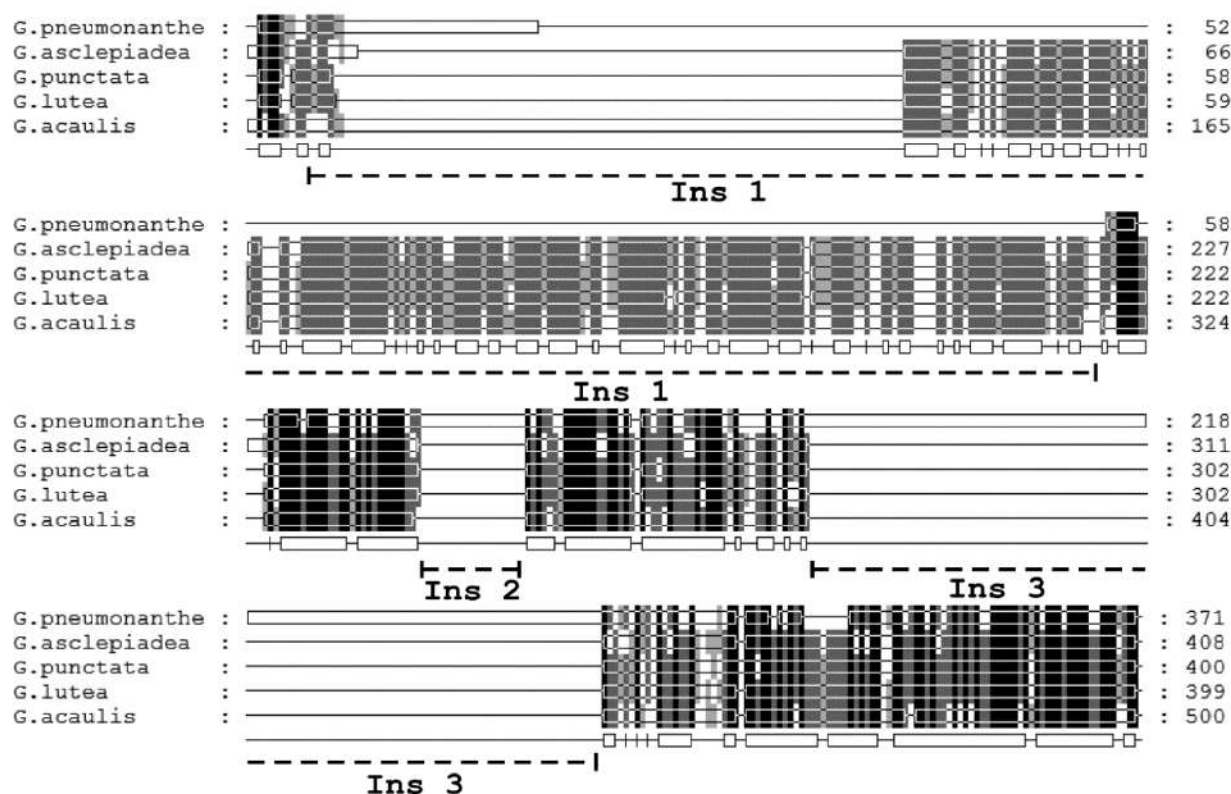


Рис. 2. Схема організації МГС 5S рДНК деяких видів роду *Gentiana*. Результати вирівнювання послідовностей за алгоритмом Muscle з уточненням вручну в програмі Uipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Фонним забарвленням показано рівень подібності послідовностей: світло-сірим — ідентичність $y \geq 60\%$, темно-сірим — $y \geq 80\%$, чорним — $y = 100\%$. В нижньому рядку показано ділянки, які є консервативними у більшості досліджених видів. **Ins 1–3** — інсерції, які відрізняють *G. pneumonanthe* та чотири інших види.

Порівняльний аналіз послідовностей МГС 5S рДНК різних видів (табл. 2) показав високий рівень подібності (93 %) для *G. punctata* і *G. lutea*, що входять до секції *Gentiana*, які відрізнялися лише за 31 нуклеотидом. Майже третину з виявлених варіацій складають заміни $T \rightarrow C$. Відмінності між двома видами секції *Pneumonanthe* — *G. pneumonanthe* і *G. asclepiadea* були набагато вищими — до 37,5 %. Це

може свідчити про їхнє помилкове об'єднання в межах секції. Як і слід було очікувати, *G. acaulis*, приналежний до секції *Ciminalis*, значно відрізнявся від видів інших секцій роду *Gentiana* за довжиною, що зумовлено наявністю великої інсерції на початку МГС, та за нуклеотидною послідовністю, відмінності становили 19–45 %.

Таблиця 2. Попарні дистанції (p-distance) між послідовностями МГС 5S рДНК деяких видів роду *Gentiana*.

Вид	1	2	3	4	5	6
1 <i>G. pneumonanthe</i> (клон 1)	*					
2 <i>G. pneumonanthe</i> (клон 2)	0,043	*				
3 <i>G. asclepiadea</i>	0,365	0,375	*			
4 <i>G. punctata</i>	0,311	0,301	0,167	*		
5 <i>G. lutea</i>	0,310	0,294	0,174	0,068	*	
6 <i>G. acaulis</i>	0,453	0,453	0,213	0,187	0,194	*

Висновки

Порівняльний аналіз нуклеотидної послідовності клонуваних ПЛР-фрагментів МГС генів 5S рРНК п'яти видів тирличів флори України дозволив встановити деякі особливості організації цієї ділянки геному у вивчених представників роду. Зокрема, показано наявність деяких типових для інших родин покритонасінних рослин мотивів, а саме консервативного оліго-dT мотиву на початку МГС, який відіграє роль ділянки термінації транскрипції, та АТ-багатої ділянки, що передує кодувальному регіону гена 5S рРНК, а також модифікація GC елемента в ділянці ініціації транскрипції. Встановлено міжвидову мінливість молекулярної організації МГС *Gentiana*, що може бути використано для уточнення філогенетичних відносин між представниками цього роду.

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

Перелік літератури:

1. Andreev I. O., Mel'nyk V. M., Myryuta G. Yu., Kunakh V. A. Polymorphism of 5S rDNA intergenic spacer in some *Gentiana* species. Factors in Experimental Evolution of Organisms. 2017. Vol. 20. P. 42–46. [in Ukrainian] / Андреев І. О., Мельник В. М., Мирюта Г. Ю., Кунах В. А. Поліморфізм міжгенного спейсера генів 5S рДНК деяких видів роду *Gentiana* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017. Т. 20. С. 42–46. doi.org/10.7124/FEEO.v20.731.
2. 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.
3. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32(5). P. 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340.
4. Favre A., Matuszak S., Sun H., Liu E., Yuan Y., Mueller-Riehl A. Two new genera of *Gentianinae* (Gentianaceae): *Sinogentiana* and *Kuepferia* supported by molecular phylogenetic evidence. Taxon. 2014. Vol. 63, No. 2. P. 342–354. doi: 10.12705/632.5.
5. Favre A., Yuan Y., Kupfer P., Alvarez N. Phylogeny of subtribe *Gentianinae* (Gentianaceae): Biogeographic inferences despite limitations in temporal calibration points. Taxon. 2010. Vol. 59, No. 6, P. 1701–1711. doi: 10.1002/tax.596005.
6. Gielly L., Taberlet P. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. Mol. Biol. Evol. 1994. Vol. 11, No. 5. P. 769–777.
7. Gielly L., Yuan Y. M., Kupfer P., Taberlet P. Phylogenetic use of noncoding regions in the genus *Gentiana* L.: Chloroplast trnL (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 1996. Vol. 5, No. 3. P. 460–466. doi: 10.1006/mpev.1996.0042.
8. Hammerli M. Molecular aspects in systematics of *Gentiana* Sect. *Calathianae* Froel. / Theses for obtaining scient. degree of Dr. of Sci. Neuchâtel, 2007. 99 p. Retrieved from: https://doc.rero.ch/record/8521/files/these_HaemmerliM.pdf.
9. Ho T.-N., Liu S.-W. The infrageneric classification of *Gentiana* (Gentianaceae). Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.), Bot. 1990. Vol. 20, No. 2. P. 169–192.
10. Ho T.-N., Liu S.-W., Lu X.-F. A phylogenetic analysis of *Gentiana* (Gentianaceae). Acta Phytotaxonomica Sinica. 1996. Vol. 34, No. 5. P. 505–530.
11. Hungerer K. B., Kadereit J. W. The phylogeny and biogeography of *Gentiana* L. sect. *Ciminalis* (Adans.) Dumort.: A historical interpretation of distribution ranges in the European high mountains. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. 1998. V. 1/1. P. 121–135. doi: 10.1078/1433-8319-00055.
12. Ishchenko O. O., Bednarska I. O., Panchuk I. I. Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe *Loliinae* (Poaceae). Cytol. Genet. 2021. Vol. 55, No. 1. P. 13–22. (in press).
13. Ishchenko O. O., Panchuk I. I., Volkov R. A. Organization of 5S rDNA of field maple (*Acer campestre* L.). Scientific Herald of Chernivtsy University. Biology (Biological Systems). 2019. Vol. 11 (1), P. 40–45. [in Ukrainian] / Іщенко О. О., Панчук І. І., Волков Р. А. Організація 5S рДНК клена польового (*Acer campestre* L.). Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2019. Т. 11(1). С. 40–45. doi: 10.31861/biosystems2019.01.040.
14. Jensen S. R., Schripsema J. Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. Gentianaceae: Systematics and Natural History / Struwe L., Albert V. A. (eds.). Cambridge, U. K. : Cambridge University Press, 2002. P. 573–632. doi: 10.1017/CBO9780511541865.007
15. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. 2018. Vol. 35, No 6. P. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
16. Kunakh V. A., Mel'nyk V. M., Drobyk N. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Twardovska M. O., Konvalyuk I. I., Adonin V. I. Genetic variation induced by tissue and organ culture in *Gentiana* species. In: Rybczyński J. J., Davey M. R., Mikula A. (Eds.). The Gentianaceae. Vol. 2. Biotechnology and Applications. Springer Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2015: 199–238.

17. Layat E., Sáez-Vásquez J., Tourmente S. Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*. 2012. Vol. 53, No. 2. P. 267–276. doi: 10.1093/pcp/pcr177.
18. Madeira F., Park Y. M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A. R. N., Potter S. C., Finn R. D., Lopez R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47(W1). P. W636–W641. doi: 10.1093/nar/gkz268.
19. Mel'nyk V. M. Polymorphism of nuclear 5S ribosomal DNA of some *Gentiana* L. species. The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine. 2013. 11(1). P. 92–95. [in Ukrainian] / Мельник В. М. Поліморфізм ядерної 5S рибосомної ДНК деяких видів роду *Gentiana* L. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2013. Т. 11(1). С. 92–95.
20. Mel'nyk V. M., Drobyk N. M., Twardovska M. O., Kunakh V. A. Karyology of European Species of Genus *Gentiana* L. In: Rybczyński J. J., Davey M. R., Mikula A. (Eds.). *The Gentianaceae*. Vol. 1. Characterization and Ecology. Springer Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2014. P. 219–230. doi: 10.1007/978-3-642-54010-3_7.
21. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. P. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
22. Rogers I., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biology*. 1985. Vol. 5. P. 69–76. doi: 10.1007/BF00020088.
23. Shelyfist A. Y., Yakobyshe D. V., Volkov R. A. Molecular structure of 5S rDNA of *Mandragora autumnalis* Bertol. The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine. 2019. Vol. 17(2). P. 187–195. [in Ukrainian] / Шелифіст А. Є., Якобишен Д. В., Волков Р. А. Молекулярна будова 5S рДНК *Mandragora autumnalis* Bertol. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2015. Т. 17(2). С. 187–195. doi: 10.7124/visnyk. utgis.17.2.1220.
24. Strashniuk N. M., Hrytsak L. R., Les'kova O. M., Mel'nyk V. M. *Gentiana* L. species of Ukrainian flora in nature and in culture *in vitro*. *Ukr. Bot. J.* 2005. Vol. 62(3). P. 337–348. [in Ukrainian] / Страшнюк Н. М., Грицак Л. Р., Леськова О. М., Мельник В. М. Види роду *Gentiana* L. флори України у природі та культурі *in vitro*. Український ботанічний журнал. 2005. Т. 62(3). С. 337–348.
25. Struwe L., Klackenberg J., Kadereit J. W., Nilsson S., Thiv M., von Hagen K. B., Albert V. A. Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification. *Gentianaceae: Systematics and Natural History* / Struwe L., Albert V. A. (eds.). Cambridge, U. K.: Cambridge University Press, 2002. P. 21–309. doi: 10.1017/CBO9780511541865.003.
26. Tutin T. G. Gentianaceae. In: Tutin T. G., Haywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. (eds) *Flora Europea*. 1972. Vol. 3. Cambridge Univ Press, Cambridge, P. 59–63.
27. 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(1). P. 81–87. [in Ukrainian] / 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.
28. Tynkevich Y. O., Volkov R. A. Novel structural class of 5S rDNA of *Rosa wichurana* Среп. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2014. No. 5. P. 143–148. [in Ukrainian] / Тинкевич Ю. О., Волков Р. А. Новий структурний клас 5S рДНК *Rosa wichurana* Среп. *Доповіді Національної академії наук України*. 2014. № 5. С. 143–148.
29. Tynkevich Yu. O., Bushyla K. D., Volkov R. A. Organization of the 5S rDNA intergenic spacer of *Quercus rubra* L. and its relationship to the Ukrainian *Quercus* species. Factors in Experimental Evolution of Organisms. 2020. Vol. 26. P. 125–131. [in Ukrainian] / Тинкевич Ю. О., Бушила К. Д., Волков Р. А. Організація міжгенного спейсера 5S рДНК *Quercus rubra* L. та його спорідненість з українськими видами роду *Quercus*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2020. Т. 26. С. 125–131. doi: 10.7124/FEEO.v26.1254.
30. Volkov R. A., Panchuk, I. I. 5S rDNA of *Dactylus glomerata* (Poaceae): Molecular organization and taxonomic application, *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2014. Vol. 12(1). P. 3–11.
31. Wong K. L., But P. H., Shaw P. C. Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal *Gentiana* species and their adulterants. *Chinese medicine*. 2013. Vol. 8, No 1. P. 16. doi: 10.1186/1749-8546-8-16.
32. Yuan Y.-M., Kupfer Ph. The monophyly and rapid evolution of *Gentiana* sect. *Chondrophyllae* Bunge s.l. (*Gentianaceae*): evidence for nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Bot. J. Linn. Soc.* 1997. Vol. 123. P. 25–43. doi: 10.1111/j.1095-8339.1997.tb01403.x.
33. Yuan Y.-M., Kupfer Ph., Doyle J. J. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (*Gentianaceae*) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Amer. J. Bot.* 1996. Vol. 83, No. 5. P. 641–652. doi: 10.1002/j.1537-2197.1996.tb12750.x.

Стаття надійшла до редакції 10.09.2020.
Прийнята до друку 19.10.2020

MOLECULAR ORGANIZATION OF 5S rDNA INTERGENIC SPACER IN *GENTIANA PNEUMONANTHE* L. AND *G. PUNCTATA* L.

V. M. Mel'nyk^{1,2}, I. O. Andreev¹, G. Yu. Myryuta¹, A. Y. Shelyfist², R. A. Volkov², V. A. Kunakh¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150
e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

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

Aim. The study was aimed at cloning and analysis of molecular organization of 5S rDNA intergenic spacer (IGS) in two *Gentiana* species of Ukrainian flora, *G. pneumonanthe* L. and *G. punctata* L. **Methods.** 5S rDNA IGS sequence was amplified using polymerase chain reaction (PCR) with a pair of primers specific for the gene coding region. The produced PCR products were fractionated by gel-electrophoresis, isolated, ligated into plasmid pUC18, cloned into *E. coli*, and then

sequenced. Nucleotide sequences were aligned using the Muscle algorithm and analyzed in the Unipro UGENE software. **Results.** The intergenic spacer region of the 5S rRNA genes was cloned and sequenced for two *Gentiana* species of Ukrainian flora, *G. pneumonanthe* and *G. punctata*. Based on the analysis of the alignment of the IGS sequences of five *Gentiana* species from three sections, some features of molecular organization of IGS of 5S rRNA genes in the studied species were established. In particular, motifs typical for other angiosperm families were identified, such as conservative oligo-dT motif at the IGS 3'-end that served as a transcription termination site and AT-rich region preceding the coding region of 5S rRNA gene. However, in the region of transcription initiation, conservative GC-element in position –13 is changed to AC. **Conclusions.** The interspecific variation of molecular organization of 5S rDNA IGS was identified among *Gentiana* species that can be used to clarify the phylogenetic relationships between members of this genus.

Keywords: *Gentiana* species, 5S rDNA intergenic spacer, molecular organization, phylogeny.