

## ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ПОЛІМОРФІЗМ МІЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА 5S рДНК ТЕРЕНУ КОЛЮЧОГО (*PRUNUS SPINOSA* L.)

Ю. О. ТИНКЕВИЧ, Л. В. КОЗУБ, Р. А. ВОЛКОВ

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

**Мета.** Повторювані одиниці 5S рДНК складаються з консервативних ділянок, які кодують 5S рРНК, і мінливих міжгенних спейсерів — *intergenic spacers* (IGS). Послідовності IGS часто використовуються як молекулярні маркери для філогенетичних, філогеографічних та мікроеволюційних досліджень таксонів низького рангу. Проте, ця область геному все ще залишається неописаною для більшості родів родини Rosaceae. У цій статті ми представляємо перші результати дослідження молекулярної організації та поліморфізму IGS для широко розповсюдженого представника родини Rosaceae, *Prunus spinosa*. **Методи.** ПЛР-ампліфікація, клонування та секвенування 5S рДНК, біоінформатичний аналіз. **Результати.** IGS 5S рДНК *P. spinosa* клонували та порівнювали з IGS трьох інших представників роду *Prunus*. Встановлено, що наявні в геномі *P. spinosa* варіанти IGS відрізняються кількістю субповторів, розташованих на 5'-кінці. Кожен з цих субповторів містить сигнал термінації транскрипції РНК Pol III. Послідовності IGS видів роду *Prunus* еволюціонують переважно шляхом накопичення нуклеотидних замінів. Рівень внутрішньогеномної подібності IGS *P. spinosa* становить 96,5–100 %, тоді як подібність між IGS різних видів *Prunus* коливається від 73,0 до 87,3%. **Висновки.** IGS 5S рДНК є перспективним маркером для філогенетичних і таксономічних досліджень в роді *Prunus*.

**Ключові слова:** 5S рДНК, молекулярна еволюція, *Prunus spinosa*.

**Вступ.** Ділянки, які кодують рибосомні рРНК (рДНК) належать до фракції середньо-повторюваних послідовностей в геномах еукаріотичних організмів. У вищих еукаріот 5S рДНК зазвичай розміщується у окремому хромосомному локусі (Hanson et al., 1996; Shaw, McKeown, 2011; Garcia et al., 2012; Roa, Guerra, 2015) та представлена кластерами тандемно організованих повторюваних одиниць (повторів), кожна з яких складається з кодувальної ділянки і міжгенного спейсера – *intergenic spacer* (IGS) (Hemleben, Werts, 1988; Gottlob-McHugh et al., 1990; Chen et al., 2021). Універсальна організація, присутність у геномах всіх еукаріотичних організмів, а також високий ступінь консервативності кодувальної ділянки та еволюційна мінливість IGS обумовлюють успішне використання 5S рДНК при вивченні еволюції повторюваних послідовностей та у молекулярній таксономії різних груп рослин (Grabiele et al., 2012; Mlinarec et al., 2016; Bolsheva et al., 2017). Здатність зберігати у геномі гібридних таксонів риси організації, які притаманні їх батьківським видам, робить 5S рДНК важливим інструментом у дослідженні явищ гібридизації/алополіплоїдизації та інтрогресії генетичного матеріалу у природних популяціях (Simeone et al., 2018; Garcia et al., 2020; Cardoni et al., 2021; Piredda et al., 2021). Тим не менш, особливості молекулярної організації 5S рДНК все ще залишаються невідомими для багатьох груп рослин. Зокрема, для великої та важливої у господарському плані родини Rosaceae організація 5S рДНК досліджена лише у наших попередніх роботах для представників роду *Rosa*. Було показано, що 5S рДНК володіє значним потенціалом як молекулярний маркер для вивчення філогенії та систематики цього роду і триби Rosaeae в цілому (Tynkevich, Volkov, 2014).

У попередніх дослідженнях нашої лабораторії було також охарактеризовано дивергенцію повторюваних послідовностей та організацію 35S рДНК у представників роду *Prunus* — важливої та складної у таксономічному плані групи рослин родини Rosaceae (Volkov et al., 1993; Volkov et al., 1994). Останнім часом геноміка, еволюція та молекулярна систематика цього роду знову привернули увагу дослідників (Shi et al., 2013; Baek et al., 2018; Zhao et al., 2018; Aranzana et al., 2019; Zhebentyayeva et al., 2019; Alioto et al., 2020; Hodel et al., 2021). Проте, молекулярна організація та еволюція 5S рДНК видів роду *Prunus* все ще недостатньо досліджена. В цій роботі ми представляємо перші результати сиквенування IGS терену колючого (*Prunus spinosa*) та аналізуємо рівень подібності IGS цього та інших видів роду *Prunus*, для яких ця ділянка геному була ідентифікована біоінформатично.

#### Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були гербаризовані листки *P. spinosa*, зібрані поблизу м. Шавник, Чорногорія (N42.97530, O19.08381). Загальну ДНК екстрагували згідно стандартної методики з використанням цетавлону в якості детергенту (Porebski et al., 1997; Panchuk, Volkov, 2007).

Для ампліфікації ділянки 5S рДНК використовували праймери 5S-L (5'-GCG AGA GTA GTA CTA GGA TGC GTG AC-3') і 5S-R (5'-GCT TAA CTT CGG AGT TCT GAT GG GA-3'), які містять послідовність, комплементарну до кодувальної ділянки 5S рДНК рослин. Застосування цих праймерів забезпечує ампліфікацію повного IGS та фланкуючих ділянок кодувальної послідовності 5S рДНК.

Реакційна суміш для ПЛР загальним об'ємом 20 мкл містила 10 нг ДНК, 0,5 мкМ кожного з праймерів та 1× полімеразну суміш FIREPol Green (SolisBioDyne, Естонія). ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора BioRad T100 (BioRad, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази та денатурація ДНК — 95 °С, 15 хв; (2) денатурація ДНК — 95 °С, 15 с; (3) гібридизація праймерів — 58 °С, 30 с; (4) синтез ДНК — 72 °С, 30 с; (5) завершення ампліфікації — 72 °С, 8 хв; припинення реакції — 4 °С; загальна кількість циклів ампліфікації становила 35.

Отримані ПЛР-продукти лігували за тупими кінцями у плазмідний вектор pJET 1.2, використовуючи набір реактивів Clone JET PCR Cloning Kit

(ThermoFisher Scientific, США). Очищені продукти лігування трансформували в компетентні клітин *E. coli* методом електропорації з використанням приладу *E. coli* Pulser (BioRad, США). Скринінг колоній проводили за резистентністю до ампіциліну. Наявність вставки перевіряли, застосовуючи ПЛР із праймерами Forward і Reverse pJET 1.2, сайти гібридизації яких знаходяться в плазмідній ДНК по обидва боки від полілінкеру. На загал було ідентифіковано 7 рекомбінантних плазмід, які містили вставку очікуваного розміру. Чотири з них було сиквенувано на фірмі LGC Genomics (Німеччина).

Первинний аналіз результатів сиквенування проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR. Пошук гомологічних послідовностей у базі даних Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST (Altschul et al., 1997). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили методом Clustal W (Thompson et al., 2003).

#### Результати та обговорення

Електрофоретичний аналіз, показав, що довшина отриманих ПЛР-продуктів становила приблизно 680–700 п.н. Такий результат може свідчити про імовірну наявність у *P. spinosa* лише одного класу за довжиною повторюваної одиниці 5S рДНК. Раніше було показано, що у геномі деяких груп покритонасінних рослин можуть бути одночасно присутні кілька класів повторів 5S рДНК, які суттєво відрізняються за довжиною IGS (Mathieu et al., 2003; Singh, Ahuja, 2006; Simeone et al., 2018), проте, у більшості досліджених видів, так само як і у терену, не виявлено значного поліморфізму за цією ознакою (Tynkevich, Volkov, 2014; Rusak et al., 2016; Ishchenko et al., 2018a, 2018b; Shelyfist et al., 2019; Ishchenko et al., 2020; Tynkevich et al., 2020).

За результатами скринінгу рекомбінантних плазмід ідентифіковано вісім клонів 5S ДНК, чотири з яких (Prspi-3, Prspi-5, Prspi-9, Prspi-18) було просиквенувано. Отримані послідовності порівнювалися між собою та з послідовностями IGS представників роду *Prunus*, які були ідентифіковані нами у базі даних референсних послідовностей RefSeq NCBI (табл. 1). Зокрема, фрагменти, які відповідають IGS 5S рДНК, було виявлено в геномах *P. tume*, *P. dulcis*, *P. persica* (Zhang et al., 2012; Verde et al., 2013; Alioto et al., 2020). Ці три види разом із *P. spinosa* представляють чотири секції у межах номінативного підроду *Prunus* (Shi et al., 2013).

**Таблиця 1.** Характеристика IGS 5S рДНК видів роду *Prunus*

Вид / секція	Клон / фрагмент ДНК		IGS		Посилання
	Назва	GenBank Acc.No	Довжина п.н.	Вміст GC-пар, %	
<i>P. spinosa</i> / <i>Prunus</i>	Prspi-3	-	571	52,5	Ця стаття
	Prspi-5	-	571	52,5	
	Prspi-9	-	555	53,1	
	Prspi-18	-	563	52,2	
<i>P. mume</i> / <i>Armeniaca</i>	Prmum (UGS ALMONDv2, 42846 - 43442 bp)	NC_024126	574	49,6	Ця стаття; Zhang et al., 2012
<i>P. dulcis</i> / <i>Amygdalus</i>	Prdul (LG1, 12624380 - 12624996 bp)	NW_023010063	554	50,0	Ця стаття; Alioto et al., 2020
<i>P. persica</i> / <i>Persica</i>	Prper (Ch G4, 23390458 - 23391054 bp)	NC_034012	562	47,8	Ця стаття; Verde et al., 2013

Порівняння отриманих нами нуклеотидних послідовностей виявило ідентичність IGS в клонах Prspi-3 та Prspi-5. Множинне вирівнювання послідовностей IGS методом ClustalW (Thompson et al., 2003) мало загальну довжину 607 п.н. та містило 223 поліморфні сайти. Середній рівень попарної подібності послідовностей у вирівнюванні складав 83,1 % (рис. 1).

По всій довжині вирівнювання зустрічаються точкові нуклеотидні заміни, проте найчастіше вони спостерігаються між позиціями 100-155 п.н. консенсусної послідовності. Також виявлено одно- та олігонуклеотидні індели (інсерції / делеції). Зокрема, на початку та в центральній частині IGS знайдено індели довжиною 16 та 14 п.н., відповідно. Індєл на початку спейсера являє собою дві копії повторюваного 8-и нуклеотидного мотиву GTCTTTT. Найбільша кількість копій цього мотиву — 4, присутня у клонах Prspi-3 та -5. Три копії цього субповтору наявні в клоні Prspi-18, і по дві — в клоні Prspi-9 та послідовностях IGS представників інших видів підроду *Prunus*. Причому, перша копія субповтору у всіх клонів *P. spinosa* коротша на перший нуклеотид, а IGS інших видів — на два початкових.

Послідовності субповторів містять у своєму складі сигнал термінації транскрипції — TTTT (Douet et al., 2007; Simon et al., 2018). В першому субповторі цей сигнал займає звичайну позицію на початку IGS (Тинкевич, Volkov, 2014; Тинкевич et al., 2015; De Souza et al., 2020; Ishchenko et al., 2021). Цікаво, що у геномі *P. spinosa* одночасно зустрічається три варіанти IGS, які містять від двох до чотирьох сигналів

термінації. Наявність двох сигналів термінації транскрипції була показана раніше для представників роду *Quercus* (Тинкевич et al., 2020). Проте, знайдене нами у геномі терену розташування термінаторної послідовності у складі субповторів та наявність більше двох її копій є новою, раніше невідомою структурною особливістю IGS, функціональне значення якої залишається незрозумілим.

В межах 3'-кінцевої частини IGS нами також ідентифіковані потенційні зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III. Ці ділянки у *Arabidopsis thaliana* представлені шестинуклеотидним ТАТАТА-боксом, GC-динуклеотидом та цитозиною у позиціях -28, -13, -1, відповідно (Douet et al., 2007; Simon et al., 2018). У представників роду *Prunus* відмінність спостерігається лише для GC-нуклеотиду: у позиції -13 знаходиться мотив GT, тоді як GC-мотив також присутній, але в позиції -15. У представників іншої групи родини Rosaceae — роду *Rosa*, GC-динуклеотид розташований в позиції -12 (Тинкевич, Volkov, 2014).

Розрахований на основі вирівнювання нуклеотидних послідовностей рівень подібності між IGS окремих клонів *P. spinosa* становить 96,5–100 %, (табл. 2), тоді як подібність між ними та IGS інших представників роду *Prunus* знаходиться в межах від 73,0 до 84,3 %. При цьому найвищу подібність до *P. spinosa* демонструє *P. mume* — 81,9–84,3 %. Такий результат свідчить на користь припущення, що секція *Armeniaca*, яку представляє *P. mume* є більш спорідненою до секції *Prunus*, ніж секції *Persica* і *Amygdalus* (Shi et al., 2013).

Організація та поліморфізм міжгенного спейсера 5S рДНК терену колючого (*Prunus spinosa* L.)

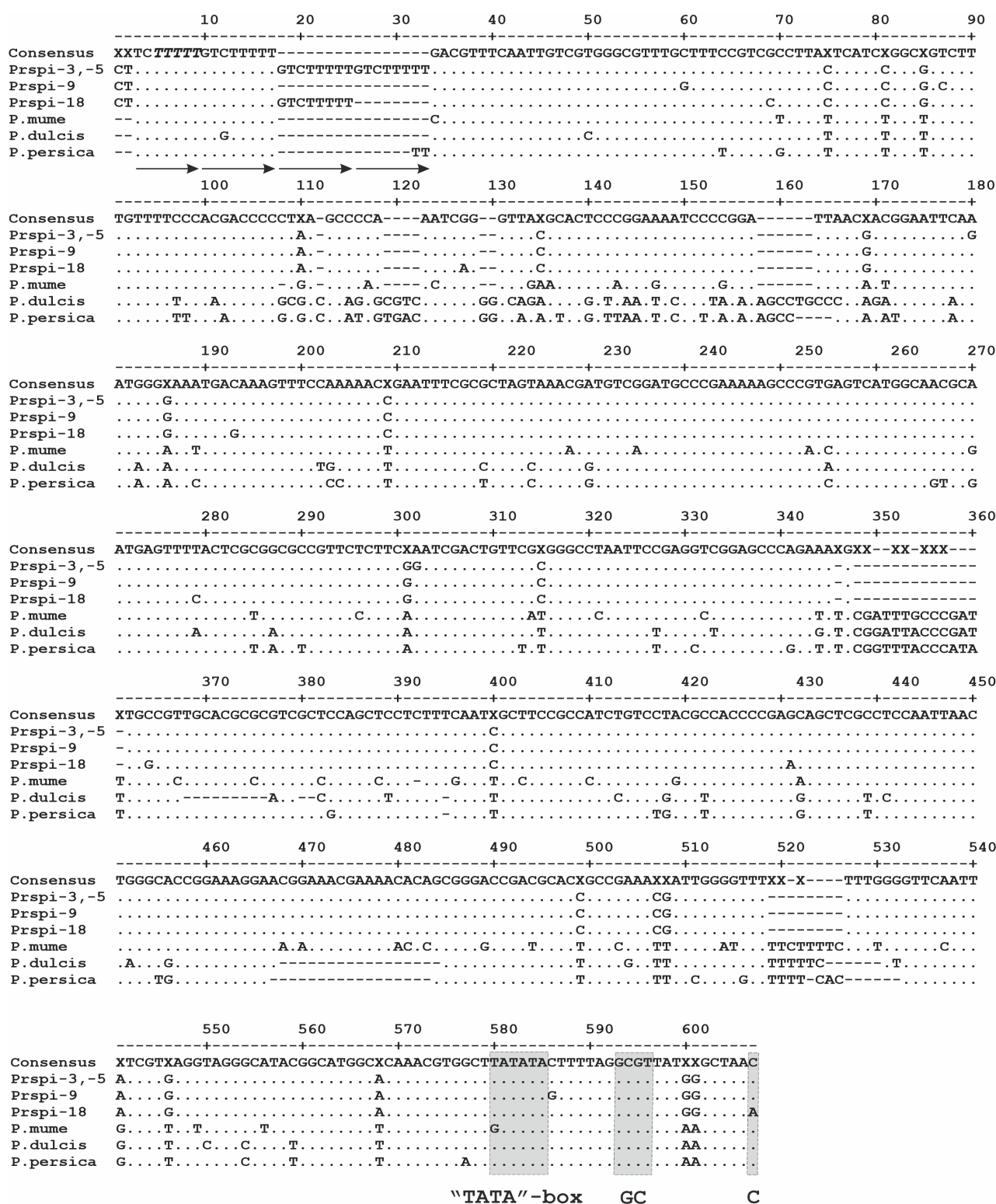


Рис. 1. Структурна організація міжгенного спейсера 5S рДНК видів роду *Prunus*. Сіримі прямокутниками виділено потенційні зовнішні елементи промотора; жирним курсивом наведено оліго-Т послідовність термінатора; стрілками позначено розташування субповторів на початку IGS.

**Таблиця 2.** Рівень подібності (%) нуклеотидної послідовності IGS 5S рДНК видів роду *Prunus*

Вид / клон	Prspi-3, -5	Prspi-9	Prspi-18	<i>P. mume</i>	<i>P. dulcis</i>	<i>P. persica</i>
Prspi-3, -5	100,0	96,5	97,2	81,9	73,0	75,1
Prspi-9		100,0	97,0	84,3	75,5	76,9
Prspi-18			100,0	82,4	73,6	75,0
<i>P. mume</i>				100,0	77,1	78,7
<i>P. dulcis</i>					100,0	87,3
<i>P. persica</i>						100,0

Встановлений діапазон рівня подібності між послідовностями IGS 5S рДНК різних видів роду *Prunus* в межах 73,0–87,3 % є оптимальним для філогенетичних досліджень. Ця особливість, разом з виявленим нами характером молекулярної еволюції IGS у представників роду, а саме — переважання одонуклеотидних замін та відсутність значних інделів, зумовлюють високий потенціал подальшого використання IGS у таксономічних дослідженнях цієї групи рослин.

#### Висновки

У геномі *P. spinosa* присутній один клас 5S рДНК із довжиною повторів 680-700 нп. Варіанти IGS 5S рДНК в геномі цього виду містять від двох до чотирьох субповторів на 5'-кінці, кожен з яких несе сигнал термінації транскрипції для РНК-полімерази III. Подібність між IGS різних видів роду *Prunus* знаходиться в межах 73,0-87,3%, які є оптимальними для внутрішньородових філогенетичних та таксономічних досліджень.

#### Перелік літератури

1. Alioto T., Alexiou K. G., Bardil A., Barteri F. et al. Transposons played a major role in the diversification between the closely related almond and peach genomes: results from the almond genome sequence. *Plant J.* 2020. Vol. 101(2). P. 455–472. doi: 10.1111/tpj.14538
2. Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25(17). P. 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389

3. Aranzana M. J., Decroocq V., Dirlwanger E., Eduardo I. et al. *Prunus* genetics and applications after de novo genome sequencing: achievements and prospects. *Hortic. Res.* 2019. Vol. 6(1). P. 1–25. doi.org/10.1038/s41438-019-0140-8
4. Baek S., Choi K., Kim G. B., Yu H. J. et al. Draft genome sequence of wild *Prunus yedoensis* reveals massive inter-specific hybridization between sympatric flowering cherries. *Genome Biol.* 2018. Vol. 19(1). P. 1–17. doi: 10.1186/s13059-018-1497-y
5. Cardoni S., Piredda R., Denk T., Grimm G. W. et al. 5S-IGS rDNA in wind-pollinated trees (*Fagus* L.) encapsulates 55 million years of reticulate evolution and hybrid origins of modern species. *bioRxiv.* 2021. doi: 10.1101/2021.02.26.433057
6. Chen G., Stepanenko A., Borisjuk N. Mosaic arrangement of the 5S rDNA in the aquatic plant *Landoltia punctata* (Lemnaceae). *Front. Plant Sci.* 2021. Vol. 12. P. 1–8. doi: 10.3389/fpls.2021.678689
7. De Souza T. B., Gaeta M. L., Martins C., Vanzella A. L. L. IGS sequences in *Cestrum* present AT- and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol. Biol. Rep.* 2020. Vol. 47(1). P. 55–66. doi: 10.1007/s11033-019-05104-y
8. 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
9. Garcia S., Garnatje T., Kovařík A. Plant rDNA database: ribosomal DNA loci information goes online. *Chromosoma.* 2012. Vol. 121(4). P. 389–394. doi: 10.1007/s00412-012-0368-7
10. Garcia S., Wendel J. F., Borowska-Zuchowska N., Ainouche M. et al. The utility of graph clustering of 5S ribosomal DNA homoeologs in plant Allopolyploids, homoploid hybrids, and cryptic intro-

- gressants. *Front. Plant Sci.* 2020. Vol. 11. P. 41. doi: 10.3389/fpls.2020.00041
11. Gottlob-McHugh S. G., Levesque M., MacKenzie K., Olson M., et al. Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. *Genome*. 1990. Vol. 33(4). P. 486–494. doi: 10.1139/g90-072
  12. Grabile M., Chalup L., Robledo G., Seijo G. Genetic and geographic origin of domesticated peanut as evidenced by 5S rDNA and chloroplast DNA sequences. *Plant Syst. Evol.* 2012. Vol. 298(6). P. 1151–1165. doi: 10.1007/s00606-012-0627-3
  13. Hanson R. E., Islam-Faridi M. N., Percival E. A., Crane C. F. et al. Distribution of 5S and 18S–28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma*. 1996. Vol. 105(1). P. 55–61. doi: 10.1007/BF02510039
  14. Hemleben V., Werts D. Sequence organization and putative regulatory elements in the 5S rRNA genes of two higher plants (*Vigna radiata* and *Matthiola incana*). *Gene*. 1988. Vol. 62(1). P. 165–169. doi: 10.1016/0378-1119(88)90591-4
  15. Hodel R. G., Zimmer E., Wen J. A. Phylogenomic approach resolves the backbone of *Prunus* (Rosaceae) and identifies signals of hybridization and allopolyploidy. *Mol. Phyl. Evol.* 2021. Vol. 160. P. 1–9. doi: 10.1016/j.ympev.2021.107118
  16. Ishchenko O., Bednarska I., Panchuk I. Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytol. Genet.* 2021. Vol. 55(1). P. 10–18. doi: 10.3103/S00954-52721010096
  17. Ishchenko O. O., Kozub V. V., Panchuk I. I. Organization of 5S ribosomal DNA of *Litchi chinensis* Sonn. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine*. 2020. Vol. 18(2). P. 3–8. [In Ukrainian] / Іщенко О. О., Козуб В. В., Панчук І. І. Організація 5S рибосомної ДНК *Litchi chinensis* Sonn. *Вісн. Укр. тов.-ва генетиків і селекціонерів*. 2020. Т. 18(2). С. 3–8. doi: 10.7124/visnyk.utgis.18.1-2.1348
  18. Ishchenko O. O., Panchuk I. I., Andreev I. O., Kunakh V. A. et al. Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol. Genet.* 2018a. Vol. 52(6). P. 416–421. doi: 10.3103/S0095452718060105.
  19. Ishchenko O. O., Derevenko T. O., Panchuk I. I. 5S rDNA of Timothy-grass *Phleum pratense* L. *Sci. Herald Chernivtsi Univ., Biol. (Biol. Syst.)*. 2018b. Vol. 10(2). P. 107–112. [In Ukrainian] / Іщенко О. О., Деревенко Т. О., Панчук І. І. 5S рДНК тимопіївки лучної (*Phleum pratense* L.). *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*. 2018b. Т. 10(2). С. 107–112. doi: 10.31861/biosystems2019.01.040.
  20. Mathieu O., Jasencakova Z., Vaillant I., Gendrel A. V. et al. Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during hetero-chromatin establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2003. Vol. 15(12). P. 2929–2939. doi: 10.1105/tpc.017467
  21. 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(1). P. 80–99. doi: 10.1111/boj.12452.
  22. Panchuk I. I., Volkov R. A. A practical course in molecular genetics. Chernivtsi: Ruta. 2007. 120 p. [In Ukrainian] / Панчук І. І. Волков Р. А. Практикум з молекулярної генетики. Чернівці: Рута. 2007. 120 с.
  23. Piredda R., Grimm G. W., Schulze E. D., Denk T. et al. High-throughput sequencing of 5S-IGS in oaks: Exploring intragenomic variation and algorithms to recognize target species in pure and mixed samples. *Mol. Ecol. Resour.* 2021. Vol. 21(2). P. 495–510. doi: 10.1111/1755-0998.13264
  24. 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(1). P. 8–15. doi: 10.1007/BF02772108.
  25. Roa F., Guerra M. Non-random distribution of 5S rDNA sites and its association with 45S rDNA in plant chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 2015. Vol. 146(3). P. 243–249. doi: 10.1159/000440930
  26. Rusak O. O., Petrashchuk V. I., Panchuk I. I., Volkov R. A. Molecular organization of 5S rDNA in two Ukrainian populations of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2016. Vol. 14(2). P. 216–220. [In Ukrainian] / Русак О. О., Петрашчук 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. doi: 10.31861/biosystems2019.01.034
  27. Shaw P. J., McKeown P. C. The structure of rDNA chromatin. *The nucleolus*. 2011. Springer, New York, NY. P. 43–55. doi: 10.1007/978-1-4614-0514-6\_3
  28. Shelyfist A. Y., Yakobyshe D. V., Volkov R. A. Molecular structure of 5S rDNA of *Mandragora autumnalis* Bertol. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. 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*. 2019. Т. 17(2). С. 187–195. doi: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1220
  29. Shi S., Li J., Sun J., Yu J., Zhou S. Phylogeny and classification of *Prunus sensu lato* (Rosaceae). *J. Integr. Plant Biol.* 2021. Vol. 55(11). P. 1069–1079. doi: 10.1111/jipb.12095
  30. Simeone M. C., Cardoni S., Piredda R., Imperatori F. et al. Comparative systematics and phylogeo-

- graphy of *Quercus* section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation. *Peer J.* 2018. Vol. 6, e5793. doi: 10.7717/peerj.5793
31. Simon L., Rabanal F. A., Dubos T., Oliver C. et al. Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res.* 2018. Vol. 46(6). P. 3019–3033. doi: 10.1093/nar/gky163.
  32. Singh D., Ahuja P. S. 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification. *Genome.* 2006. Vol. 49(1). P. 91–96. doi: 10.1139/g05-065
  33. Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D.G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinform.* 2003. P. 2–3. doi: 10.1002/0471250953.bi0203s00
  34. Tynkevich Y., Bushyla K., Volkov R. Organization of the 5S rDNA intergenic spacer of *Quercus rubra* L. and its relationship to the Ukrainian *Quercus* species. *Factors Experimental Evol. 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.
  35. Tynkevich Y., Nevelska A., Chorney I., Volkov R. Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. 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.
  36. Tynkevich Y. O., Volkov R. A. Novel structural class of 5S rDNA of *Rosa wichurana* Среп. *Допов. Нас. Акад. Наук Укр.* 2014. № 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. doi: 10.15407/dopovidi2014.05.143
  37. Verde I., Abbott A. G., Scalabrin S., Jung S. et al. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat. Genet.* 2013. Vol. 45(5). P. 487–494. doi: 10.1038/ng.2586
  38. Volkov R. A., Kostishin S. S., Panchuk I. I. Evolution of repetitive sequences in species of subfamily Prunoideae. *Ukr. Botan. J.* 1994. Vol. 51(2/3). P. 110–115
  39. Volkov R. A., Kostishin S. S., Panchuk I. I. rDNA organization in species from subfamily Prunoideae. *Molecular Biology (Moscow).* 1993. Vol. 27(6). P. 1356–1367
  40. Zhang Q., Chen W., Sun L., Zhao F. et al. The genome of *Prunus mume*. *Nat. Commun.* 2012. Vol. 3(1). P. 1–7. doi: 10.1038/ncomms2290
  41. Zhao L., Potter D., Xu Y., Liu P.L. et al. Phylogeny and spatio-temporal diversification of *Prunus* subgenus *Laurocerasus* section *Mesopygeum* (Rosaceae) in the Malaysian region. *J. Syst. Evol.* 2018. Vol. 56(6). P. 637–651. doi: 10.1111/jse.12467
  42. Zhebentyayeva T., Shankar V., Scorza R., Callahan A. et al. Genetic characterization of worldwide *Prunus domestica* (plum) germplasm using sequence-based genotyping. *Hortic. Res.* 2019. Vol. 6(1). P. 1–13. doi: 10.1038/s41438-018-0090-6

### ORGANIZATION AND POLYMORPHISM OF 5S rDNA INTERGENIC SPACER OF BLACKTHORN (*PRUNUS SPINOSA* L.)

Y. O. Tynkevich, L. V. Kozub, R. A. Volkov

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

**Aim.** The 5S rDNA repeated units consist of conserved regions encoding 5S rRNA and variable intergenic spacers (IGS). The IGS sequences are commonly used as molecular markers for low-ranking phylogenetic, phylogeographical and microevolutionary studies. However, this genomic region still remains undescribed for the waist majority of genera in the Rosaceae family. Here we present the first report of the IGS molecular organization and polymorphism for the widespread member of the Rosaceae family, *Prunus spinosa*. **Methods.** PCR amplification, cloning and sequencing of 5S rDNA, bioinformatics analysis. **Results.** The 5S rDNA IGS of *P. spinosa* was cloned sequenced and compared with the IGS of three other representatives of the genus *Prunus*. It was found that the IGS variants present in the genome of *P. spinosa* differ by the number of subrepeats located at the 5'end. Each of these subrepeats contain RNA Pol III transcription termination signal. The IGS sequences of *Prunus* species evolved mainly by accumulation of nucleotide substitutions. The level of intragenomic similarity of *P. spinosa* IGS is 96.5–100 %, while the similarity between the IGS of different *Prunus* species ranges from 73.0 to 87.3 %. **Conclusions.** The IGS of 5S rDNA represents a useful marker for phylogenetic and taxonomic studies in the genus *Prunus*.

**Keywords:** 5S rDNA, molecular evolution, *Prunus spinosa*.