УДК 577.113.5 + 582.52/.59 *https://doi.org/10.31861/biosystems2020.02.135*

ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК *POA PRATENSIS* L.

О. О. ІЩЕНКО, Р. А. ВОЛКОВ

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

Однією зі зручних моделей для дослідження молекулярної еволюції рослин є 5S рДНК, яка належить до класу повторюваних послідовностей. Повторювана одиниця 5S рДНК складається з консервативної ділянки, яка кодує 5S рРНК, та варіабельного міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS), в якому містяться мотиви, що необхідні для ініціації та термінації транскрипції. Саме послідовності IGS можуть слугувати молекулярним маркером для дослідження філогенетичних відносин таксонів низького рангу. На сьогодні молекулярна організація 5S рДНК у видів родини Poaceae, до якої належать багато економічно важливих культур, все ще недостатньо вивчена. Тому метою роботи було дослідити організацію і поліморфізм IGS 5S рДНК у геномі тонконогу лучного (Poa pratensis L.), представника одного з найбільших родів родини Poaceae. З використанням ПЛР-ампліфікації, клонування, сиквенування та аналізу бази даних SRA встановлено, що в геномі Poa pratensis присутні як мінімум два варіанти повторюваної одиниці 5S рДНК. Обидва варіанти мають кодувальну ділянку довжиною 119 нп, тоді як довжина IGS змінюється у межах від 169 до 185 нп. На початку IGS присутня оліго-Т послідовність термінатора транскрипції РНК-полімерази III. Потенційні зовнішні елементи промотора 5S рДНК у представників родини Злаки відрізняються від таких у досліджених раніше груп рослин.

Ключові слова: 5S рДНК, міжгенний спейсер, молекулярна еволюція, повторювані послідовності, Poa pratensis L., Poaceae.

Вступ. Більше половини геному вищих рослин складають повторюванні послідовності, значна частина яких є специфічними для споріднених видів. Виключення становлять ділянки, які кодують рРНК (так звана рДНК), і які наявні у всіх живих організмів. Відповідно, рДНК являє універсальну модель для вивчення еволюції повторюваних послідовностей (Benabdelmouna et al., 2001; Cloix et al., 2000; Denk and Grimm, 2010; Volkov et al., 2003).

У еукаріот 5S рДНК представлена тисячами копій повторюваних одиниць (повторів), які організовані тандемно та складається з консервативної кодувальної ділянки та варіабельного міжгенного спейсера (intergenic spacer - IGS). Послідовності IGS швидко еволюціонують та накопичують мутації і можуть відрізнятися у споріднених видів або навіть у популяцій одного виду (Русак та ін., 2016; Fulnecek et al., 2002; Ishchenko et al., 2018a; Mlinarec et al., 2016). Послідовність IGS містить зовнішні елементи промотора та термінатор РНК-полімерази III (Layat et al., 2012). Проте, з літератури та наших попередніх досліджень відомо, що ці ділянки можуть відрізнятися у різних таксономічних груп покритонасінних рослин (Іщенко та ін.,2018b; Русак та ін., 2016; Тинкевич та Волков, 2014; Тинкевич та ін., 2015; Шелифіст та ін., 2018; Baum et al., 2003; Röser et al., 2001; Volkov and Panchuk, 2014). Тому, задля розуміння еволюції транскрипційного апарату РНК-полімерази III видається важливим порівняти молекулярну організацію IGS 5S рДНК у широкого кола видів.

Однією з найбільших та економічно важливих є родина Злакові (Poaceae). Незважаючи на попередні дослідження, проведені для представників кількох родів (Іщенко та ін.,2018b; Ishchenko et al., 2018a; Röser et al., 2001; Peng et al., 2008; Volkov and Panchuk, 2014), 5S рДНК все ще залишається недостатньо вивченою для цієї групи рослин. Зокрема, нічого невідомо про організацію цієї ділянки геному у представників роду *Poa,* найбільшого у трибі Poeae. Тому ми поставили перед собою мету проаналізувати молекулярну організацію 5S рДНК тонконога лучного (*Poa pratensis* L.), широко поширеного кормового виду.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження був зразок *P. pratensis,* зібраний на околицях с. Селище, Сокирянського району, Чернівецької області, наданий нам кафедрою ботаніки, лісового і садово-паркового господарства Чернівецького національного університету.

Виділення ДНК проводили за стандартною методикою (Porebski et al., 1997). Ампліфікацію повторюваної одиниці 5S рДНК здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням пари універсальних праймерів 5S-14a-Not (5'– CAA TGC GGC CGC GAG AGT AGT ACT AGG ATG CGT GAC–3') і 5S-15-Not (5'– CAT TGC GGC CGC TTA ACT TCG GAG TTC TGA TGG GA–3'), які комплементарні до ділянки,

що кодує 5S рРНК. Застосування цих праймерів забезпечує ампліфікацію повного IGS та фланкувальних ділянок кодувальної послідовності. Отримані ПЛР-продукти за допомогою набору для клонування Cloning Jet (Thermo Fisher Scientific, USA) лігували у плазмідний вектор pJet 1.2. Отриманими продуктами лігування трансформували компетентні клітин *Escherichia coli* (штам XL-blue). Наявність вставки у плазмідах перевіряли за допомогою ПЛР із праймерами forward (For) та reverse (Rev) для вектора pJet 1.2, сайти гібридизації яких знаходяться в плазмідній ДНК з двох боків від полілінкеру. Отриманий ПЛР-продукт, що містив вставку, сиквенували на фірмі Europhins Genomics (Німеччина).

Також було ідентифіковано послідовності 5S рДНК тонконога лучного у міжнародній базі даних SRA (sequence read archive). Аналіз повногеномного архіву SRX5824432 було здійснено за допомогою програми SeqMan NGen 14.

Первинну обробку нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою комп'ютерних програм Chromas та DNASTAR. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Clustal W (Larkin et al., 2007).

Результати та їх обговорення. Електрофоретичний аналіз ампліфікованих послідовностей 5S рДНК показав наявність одного ПЛР-продукту довжиною приблизно 300 нп. Подібна довжина характерна і для інших представників родини Poaceae (Іщенко та ін.,2018b; Ishchenko et al., 2018a; Volkov and Panchuk, 2014). В подальшому отриманий ПЛР-продукт клонували у плазмідний вектор pJet 1.2. В ході експерименту по клонуванню для досліджуваного зразка нами було відібрано шість рекомбінантних клонів та з використанням ПЛР перевірено їх на наявність вставки. Виявилось, що всі клони містять вставку однакової довжини. Клон Popra12 було обрано для сиквенування. Комп'ютерний аналіз отриманої послідовності показав, що в складі вставки наявний IGS 5S рДНК, який фланкований з обох сторін фрагментами кодувальної ділянки.

Аналіз повногеномного архіву SRX5824432 дозволив нам отримати послідовності трьох повторів 5S рДНК *P. pratensis*: Popra-Rep3, Popra-Rep2 та Popra-Rep1. В межах отриманих послідовностей було виявлено IGS та кодувальні ділянки довжиною 119 нп. Такий розмір кодувальної ділянки характерний для переважної більшості вищих рослин (Тинкевич та Волков, 2014; Kolano et al., 2019; Mlinarec et al., 2016; Peng et al., 2008; Röser et al., 2001; Singh and Ahuja, 2006).

Аналіз отриманих послідовностей також показав, що довжина IGS 5S рДНК *P. pratensis* дорівнює 169-185 нп, а вміст GC пар становить 51,48-53,55% (табл. 1). Порівняння наших нових результатів із даними попередніх досліджень показує, що така довжина IGS є типовою для представників родини Poaceae, у яких вона знаходиться в межах від 88 до 329 нп (Baum and Johnson 2018; Peng et al., 2008; Röser et al., 2001; Yang et al., 2019).

Таблиця 1.

Характеристика IGS 5S рДНК Poa pratensis L.

Table 1.

Characteristics of the 5S rDNA IGS of Poa pratensis L.

Назва зразка	**Довжина IGS, нп**	**Вміст GC пар в IGS, %**
Popra12	182	53,30
Popra-Rep1	185	52,97
Popra-Rep2	183	53,55
Popra-Rep3	169	51,48

Вирівнювання послідовностей IGS показало високу подібність між ними – від 94,6 до 100% (табл. 2). Нуклеотидні послідовності IGS 5S рДНК *P. pratensis* відрізняються між собою лише поодинокими замінами нуклеотидів та однонуклеотидними інделами (інсерціями/делеціями), розкиданими по всій довжині IGS. Крім того, у Popra-Rep3 виявлено делецію довжиною 14 нп на початку IGS (рисунок). Таким чином, можна стверджувати, що у геномі *P. pratensis* наявні як мінімум два класи повторюваної послідовності 5S рДНК, що відрізняються за довжиною. З літератури відомо, що у Злакових можуть зустрічатись як один, так і декілька класів рДНК, які відрізняються довжиною повтору (Baum et al., 2004; Ishchenko et al., 2018a; Peng et al., 2008).

Таблиця 2.

Внутрішньогеномний рівень подібності (%) IGS 5S рДНК Poa pratensis L.

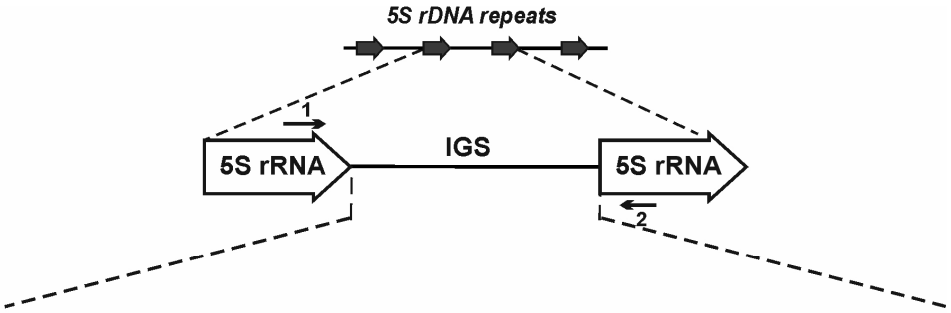
Table 2.

Intragenomic sequence similarity (%) of the 5S rDNA IGS of Poa pratensis L.

Зразок	Popra12	Popra-Rep1	Popra-Rep2	Popra-Rep3
Popra12	100	97,3	95,1	94,6
Popra-Rep1		100	96,7	96,4
Popra-Rep2			100	100
Popra-Rep3				100

Детальний аналіз послідовностей дозволив ідентифікувати в IGS *P. pratensis* мотиви, необхідні для роботи РНК-полімерази III, яка забезпечує транскрипцію 5S рДНК. Зокрема, до таких мотивів, належить оліго-Т послідовність, яка локалізована після 3'-кінця кодувальної ділянки і імовірно виконує функцію термінатора транскрипції (Douet and Tourmente, 2007).

Крім того, доведено, що у IGS знаходяться зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III, які беруть участь в ініціації транскрипції. Детально це питання вивчено для виду *Arabidopsis thaliana* (родина Brassicaceae), для якого встановлено, що до таких елементів належать мотиви TATATA, GC та C, які знаходяться у IGS, відповідно, у позиціях -28, -13 та -1 від 5'-кінця кодувальної ділянки (Layat et al., 2012). Також відомо, що подібні елементи присутні і в інших покритонасінних рослин (Стратійчук та ін., 2019; de Souza et al., 2020; Falistocco et al. 2007; Saini and Jawali, 2009; Schneeberger et al., 1989; Zhu et al., 2008). Аналіз розшифрованих послідовностей IGS показав, що у *P. pratensis* у позиції –1, як і у інших покритонасінних рослин, присутній нуклеотид C (рис. 1).




```
                    10        20        30        40        50
           ---------+---------+---------+---------+---------+
Majority   TCCTTTTTGCGCCACGCGACGACGGCCACGGTGAAAGTGTTGGAAATATT
Popra12    ..................................................
Popra-Rep1 ..................................................
Popra-Rep2 ..................................................
Popra-Rep3 ................--------------....................

                    60        70        80        90       100
           ---------+---------+---------+---------+---------+
Majority   TTTTYC-GCGTGCCCTCGTGGCTGGGTTTTT-CGGTAAATTCGGTGAACT
Popra12    ....T.-....................A...-..................
Popra-Rep1 ....T.C........................G..................
Popra-Rep2 ....C.-........................-..................
Popra-Rep3 ....C.-........................-..................

                   110       120       130       140       150
           ---------+---------+---------+---------+---------+
Majority   TCGAGAGGGCATGGTARAATGGCGCGCAGGCACGAGATAARYTCGGGAGG
Popra12    .........-G.....A..........G..........G.AT........
Popra-Rep1 ................A......................GAT........
Popra-Rep2 ................G......................GC.........
Popra-Rep3 ................G......................GC.........

                   160       170       180
           ---------+---------+---------+-----
Majority   AGCAAGCATAAGGGAAAACGGMGTGGAAACATGTC
Popra12    ......................C.............
Popra-Rep1 ......................C.............
Popra-Rep2 ......................A.............
Popra-Rep3 ......................A.............
```

Рис. 1. Структурна організація IGS 5S рДНК Poa pratensis L.

Жирним шрифтом виділено оліго-Т послідовність потенційного термінатора. Жирним підкресленим шрифтом виділено передбачувані зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III. Скорочення назв клонів та їх характеристики наведено у табл. 1.

Fig. 1. Structural organization of 5S rDNA IGS of Poa pratensis.

Pr1 and Pr2, primers 5S-14a-Not and 5S-15-Not, respectively. The oligo-T sequence of terminator is shown in bold; putative external elements of RNA polymerase III promoter are presented in bold and underlined. Abbreviations of clone names and their characteristics are given in table 1.

У позиції -28 від початку кодувальної ділянки у *P. pratensis* знаходиться мотив ATAA. Цей AT-багатий є вкороченим порівняно з *A. thaliana* та іншими дводольними рослинами. Проте, такий мотив є характерним і для інших злакових (Іщенко та ін., 2018b; Ishchenko et al., 2018a; Volkov and Panchuk, 2014).

У IGS *P. pratensis* динуклеотид GC відсутній у позиції –13 у всіх порівнюваних послідовностях. Натомість, у Popra12 та Popra-Rep1 він знаходиться у позиції –15. У двох інших послідовностях IGS такий мотив відсутній. Проте, варто зазначити, що у всіх послідовностях, використаних для порівняння, ділянка від -17 до -10 нп є збагаченою на GC-пари. Відповідно, можна висунути припущення, що ця ділянка може слугувати елементом промотора 5S рДНК.

Назагал складається враження, що у 5S рДНК видів родини Poaceae організація зовнішніх елементів промотора відрізняється від такої у досліджених раніше рослин. Прояснення цього питання потребує подальших досліджень.

Висновки. У геномі *P. pratensis L.* присутні як мінімум два різні за довжиною IGS класи повторюваної одиниці 5S рДНК. На початку IGS присутня оліго-T послідовність термінатора транскрипції РНК-полімерази III. Потенційні зовнішні елементи промотора 5S рДНК у представників родини Злаки відрізняються від таких у досліджених раніше груп рослин.

Подяка. Автори висловлюють щиру подяку проф. І.І. Чорнею, завідувачу кафедри ботаніки, лісового і садово-паркового господарства Чернівецького національного університету за наданий для досліджень гербарний зразок тонконога лучного.

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

Список літератури:

1. Іщенко О.О., Панчук І.І. Molecular organization of 5S rDNA of perennial ryegrass *Lolium perenne* L. // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2018b. – Т. 16, 2. – С. 166–173. doi:10.7124/visnyk.utgis.16.2.1054
2. Русак О.О., Петращук 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. Стратійчук А.С., Деревенко Т.О., Тинкевич Ю.О. Організація повторюваної ділянки 5S рДНК *Quercus imbricaria* Michx. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2019. – Т. 17, № 2. – С. 179–186. doi: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1219.
4. Тинкевич Ю.О., Волков Р.А. Новий структурний клас 5S рДНК *Rosa wichurana* Crep. // Доповіді Національної академії наук України. – 2014. – № 5. – С. 143-148.
5. Тинкевич Ю.О., Невельська А.О., Чорней І.І., Волков Р.А. Організація міжгенного спейсера 5S рДНК *Lathyrus venetus* // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2015. – Т. 13, №1. – С. 81-87.
6. 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.
7. Benabdelmouna A., Abirached-Darmency M., Darmency H. Phylogenetic and genomic relationships in *Setaria italica* and its close relatives based on the molecular diversity and chromosomal organization of 5S and 18S-5.8S-25S rDNA genes. *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – Vol. 103. – P. 668–677. doi: 10.1007/s001220100596.
8. Baum B.R., Johnson D.A. *Lophopyrum* Á. Löve (1980), *Thinopyrum* Á. Löve (1980), *Trichopyrum* Á. Löve (1986): one, two or three genera? A study based on the nuclear 5S DNA // Genet. Resour. Crop. Evol. – 2018. – No. 65. – P. 161–186.
9. Baum B.R., Bailey L.G., Johnson D.A., Agafonov A.V. Molecular diversity of the 5S rDNA units in the *Elymus dahuricus* complex (Poaceae: Triticeae) supports the genomic constitution of St, Y, and H haplomes // Can. J. Bot. – 2003. – Vol.81, No 11. – P. 1091–1103. doi:10.1139/b03-102
10. Baum B.R., Bailey L.G., Belyayev A. et al. The utility of the nontranscribed spacer of 5S rDNA units grouped into unit classes assigned to haplomes – a test on cultivated wheat and wheat progenitors // Genome. – 2004. – Vol. 47, No. 3. – P. 590–599. doi: 10.1139/g03-146.
11. Cloix C., Tutois S., Mathieu O. et al. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms // Genome Res. – 2000. – Vol. 10. – P. 679-690. doi:10.1101/gr.10.5.679.
12. 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. – 2020. – Vol. 47. – P. 55–66. doi: 10.1007/s11033-019-05104-y
13. Denk T., Grimm G. The oaks of western Eurasia: Traditional classifications and evidence from two nuclear markers // Taxon. – 2010. – Vol. 59. – P. 351-366. doi:10.1002/tax.592002.
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, No. 1. – P. 5– 13. doi:10.1038/sj.hdy.6800964.
15. Falistocco E., Passeri V., Marconi G. Investigations of 5S rDNA of *Vitis vinifera* L.: sequence analysis and physical mapping. // Genome. – 2007. – Vol. 50, No.10. – P. 927–938. doi: 10.1139/G07-070
16. Fulnecek J., Lim K.Y., Leitch A.R. et al. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species // Heredity. – 2002. – Vol. 88. – P. 19-25. doi: 10.1038/sj.hdy.6800001.
17. Ishchenko O.O., Panchuk I.I., Andreev I.O. et al. Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica* // Cytol. Genet. – 2018a. – Vol. 52, No 6. – P. 416–421. doi: 10.3103/S0095452718060105.
18. Kolano B.M., Cann J., Oskędra M. et al (2019) Parental origin and genome evolution of several eurasian

hexaploid species of *Chenopodium* (Chenopodiaceae) // Phytotaxa. – 2019. – Vol. 392, No. 3. – P. 163-185. doi: 10.11646/phytotaxa.392.3.1
19. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. // Bioinformatics. – 2007. – Vol. 23, No. 21. – P. 2947-2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
20. 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.
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, No. 1. – P. 80-99. doi:10.1111/boj.12452.
22. Peng Y.Y., Wei Y.M., Baum B.R., Zheng Y.L. Molecular diversity of the 5S rRNA gene and genomic relationships in the genus *Avena* (Poaceae: Aveneae) // Genome. – 2008. – Vol. 51, No. 2. – P. 137-154. doi: 10.1139/G07-111.
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. Röser M., Winterfeld G., Grebenstein B., Hemleben V. Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae) // Mol. Phylogen. Evol. – 2001. – Vol. 21, No 2. – P. 198–217. doi: 10.1006/mpev.2001.1003.
25. Saini A., Jawali N. Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications // Plant Syst. Evol. – 2009. – Vol. 280, No. 3-4. – P. 187–206. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4.
26. Schneeberger R.G., Creisse G.P., Cullis C.A. Chromosomal and molecular analysis of 5S RNA gene organization in the flax, *Linum usitatissimum* // Gene. – 1989. – Vol. 83. No.1. – P. 75–84. doi: 10.1016/0378-1119(89)90405-8.
27. 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, No. 1. – P. 91–96. doi: 10.1139/g05-065
28. Volkov A.R., Panchuk I.I. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application // The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders. – 2014. – Vol. 12, No. 1. – P. 3-11.
29. 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. 24.
30. Yang C.R., Baum B.R., Johnson D.A. et al. Molecular diversity of the 5S nuclear ribosomal DNA in *Campeiostachys* with StHY haplome constitution // J. Syst. Evol. – 2019. – Vol. 58, No. 1. – P. 69–76. doi: 10.1111/jse.12484.
31. Zhu X.Y., Cai D.T., Ding Y. Molecular and cytological characterization of 5S rDNA in *Oryza* species: genomic organization and phylogenetic implications // Genome. – 2008. – Vol. 51, No. 5. – 332–340. doi: 10.1139/G08-016.

References:

1. Ishchenko OO, Panchuk II (2018b) Molecular organization of 5S rDNA of perennial ryegrass *Lolium perenne* L. *Bull Vavilov Soc Genet Breed Ukr*. 2018c; 16(2):166–173. doi:10.7124/visnyk.utgis.16.2.1054
2. Rusak OO, Petrashchuk VI, Panchuk II, Volkov RA. Molecular organization of 5S rDNA in two Ukrainian populations of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine.* 2016; 14(2): 216–220.
3. Stratiichuk AS, Derevenko TO, Tynkevych YO. Organization of 5S rDNA repeated unit of *Quercus imbricaria* Michx. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine*. 2019; 17(2): 179–186. doi: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1219
4. Tynkevich YuO, Volkov RA. Novel structural class of 5S rDNA of *Rosa wichurana* Crep. *Reports of the National Accamdemy of Sciences of Ukraine*. 2014; 5: 143–148.
5. Tynkevich YO, Nevelska AO, Chorney II, Volkov RA. Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine*. 2015; 13(1): 81–87.
6. Shelyfist AY, Tynkevich YO, Volkov RA. Molecular organization of 5S rDNA *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine*. 2018; 16(1): 61–68.
7. Benabdelmouna A, Abirached-Darmency M, Darmency H. Phylogenetic and genomic relationships in *Setaria italica* and its close relatives based on the molecular diversity and chromosomal organization of 5S and 18S-5.8S-25S rDNA genes. *Theor. Appl. Genet.* 2001; 103: 668–677. doi: 10.1007/s001220100596
8. Baum B.R., Johnson D.A. *Lophopyrum* Á. Löve (1980), *Thinopyrum* Á. Löve (1980), *Trichopyrum* Á. Löve (1986): one, two or three genera? A study based on the nuclear 5S DNA. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2018; 65: 161–186.
9. Baum BR, Bailey LG, Johnson DA, Agafonov AV Molecular diversity of the 5S rDNA units in the *Elymus dahuricus* complex (Poaceae: Triticeae) supports the genomic constitution of St, Y, and H haplomes. *Can. J. of Bot.* 2003; 81(11): 1091–1103. doi:10.1139/b03-102
10. Baum BR, Bailey LG, Belyayev A et al. The utility of the nontranscribed spacer of 5S rDNA units grouped into unit classes assigned to haplomes – a test on cultivated wheat and wheat progenitors. *Genome*. 2004; 47(3): 590–599. doi: 10.1139/g03-146
11. Cloix C, Tutois S., Mathieu O et al. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome–specific polymorphisms. *Genom Res*. 2000; 10: 679–690. doi:10.1101/gr.10.5.679
12. de Souza TB, Gaeta ML, Martins C, Vanzela ALL. IGS sequences in *Cestrum* present AT-and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol Biol Reports* 2020; 47: 55–66. doi: 10.1007/s11033-019-05104-y
13. Denk T, Grimm G. The oaks of western Eurasia: Traditional classifications and evidence from two nuclear markers. *Taxon*. 2010; 59(2): 351–366. doi:10.1002/tax.592002
14. Douet J, Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Ar-*

abidopsis thaliana and *Xenopus laevis. Heredity*. 2007; 99(1): 5–13. doi:10.1038/sj.hdy.6800964
15. Falistocco E, Passeri V, Marconi G. Investigations of 5S rDNA of *Vitis vinifera* L.: sequence analysis and physical mapping. *Genome.* 2007; 50(10): 927–938. doi: 10.1139/G07-070
16. Fulnecek J, Lim KY, Leitch AR et al. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity*. 2002; 88:19-25. doi: 10.1038/sj.hdy.6800001
17. Ishchenko OO, Panchuk II, Andreev IO et al. Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol. Genet.* 2018a; 52(6): 416–421. doi: 10.3103/S0095452718060105
18. Kolano BM, Cann J, Oskędra M et al. Parental origin and genome evolution of several eurasian hexaploid species of *Chenopodium* (Chenopodiaceae). *Phytotaxa*. 2019; 392(3):163–185. doi: 10.11646/phytotaxa.392.3.1
19. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007; 23(21): 2947-2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404
20. 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; 53(2): 267–276. doi: 10.1093/pcp/pcr177
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; 182(1): 80–99. doi:10.1111/boj.12452
22. Peng YY, Wei YM, Baum BR, Zheng YL. Molecular diversity of the 5S rRNA gene and genomic relationships in the genus *Avena* (Poaceae: Aveneae). *Genome.* 2008; 51(2): 137–154. doi: 10.1139/G07-111
23. Porebski S, Bailey LG, Baum BR. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1997; 15(1): 8–15. doi: 10.1007/BF02772108
24. Röser M, Winterfeld G, Grebenstein B, Hemleben V. Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae). *Mol. Phylogen. Evol*. 2001; 21(2): 198–217. doi: 10.1006/mpev.2001.1003
25. Saini A, Jawali N. Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus Ceratotropis and its phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* 2009; 280(3-4): 187–206. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4
26. Schneeberger RG, Creisse GP, Cullis CA. Chromosomal and molecular analysis of 5S RNA gene organization in the flax, *Linum usitatissimum*. *Gene*. 1989; 83(1): 75–84. doi: 10.1016/0378-1119(89)90405-8
27. Singh D, Ahuja PS. 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification. *Genome.* 2006; 49(1): 91–96. doi: 10.1139/g05-065
28. Volkov AR, Panchuk II. 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine*. 2014; 12(1): 3–11.
29. Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk LG, Borisjuk MV. Plant rDNA: Organization, evolution, and using. *Cytol. Genet*. 2003; 37(1): 68–72.
30. Yang CR, Baum BR, Johnson DA et al. Molecular diversity of the 5S nuclear ribosomal DNA in *Campeiostachys* with StHY haplome constitution. *J. Syst. Evol.* 2019; 58(1): 69–76. doi: 10.1111/jse.12484
31. Zhu XY, Cai DT, Ding Y. Molecular and cytological characterization of 5S rDNA in *Oryza* species: genomic organization and phylogenetic implications. *Genome*. 2008; 51(5): 332-340. doi: 10.1139/G08-016

ORGANIZATION OF 5S RIBOSOMAL DNA OF *POA PRATENSIS* L.

O. O. Ishchenko, R. A. Volkov

5S rDNA, which belongs to the class of repeated sequences, represents a convenient model for studying the molecular evolution of plants. The 5S rDNA repeated unit consists of a conserved region encoding 5S rRNA and variable intergenic spacer (IGS) that contains the motifs required for initiation and termination of transcription. The IGS sequences can be used as a molecular marker for elucidation of the phylogenetic relationships of low-ranking taxa. Today, the molecular organization of 5S rDNA in species of the Poaceae family, which includes many economically important crops, is still poorly understood. Therefore, the aim of the study was to investigate the organization and polymorphism of 5S rDNA IGS in the genome of Poa pratensis L., a member of one of the largest genera of the Poaceae family. Using PCR amplification, cloning, sequencing and analysis of the SRA database, two variants of the 5S rDNA repeated units were found in the genome of P. pratensis. The two variants possess 119 bp-long coding regions, whereas the length of IGS ranges from 169 to 185 bp. At the beginning of IGS, the oligo-T sequence of the RNA polymerase III transcription terminator is present. In members of the Poaceae family, the putative external elements of the 5S rDNA promoter differ from those in previously studied groups of plants.

Keywords: 5S rDNA, intergenic spacer, molecular evolution, repeated sequences, Poa pratensis L., Poaceae.

Отримано редколегією 07.07.2020